

Т. 10, № 1-2, 1991

ISSN 0203-393X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 10, ВЫП. 1—2
ЯНВАРЬ—ИЮНЬ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЕНИИ
ЕРЕВАН 1991

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

Сдано в набор 2.10.1992 г. Подписано к печати 20.04.1992 г.
Формат 70×108¹/₁₆. Бумага № 1 «сыктывкарская». Высокая печать.
Печ. лист. 7,0. Усл.-печ. лист. 9,8. Усл. кр. от 9,8. Учет.-изд. 7,95.
Тираж 590. Заказ 260. Издат. 7966. Цена 3 р. 30 коп.

Адрес редакции: 375044, Ереван, ул. П. Севака 5/1.
Издательство АН Армении, 375019, Ереван, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

А. ЛАЙТА (США)—соредактор

Н. Ф. АВРОВА, Г. В. АПРИКЯН, А. В. АРУТЮНЯН (зам. главного редактора),
Н. А. БАРХУДАРЯН, (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. ЭТИНГФ

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, хромоаффинных грапул и т. д.

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

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

Подписку на журнал «Нейрохимия» можно осуществить во всех отделениях «Союзпечати» (индекс для подписки—70637), а за границей через агентство «Международная книга». «Журнал выходит 4 раза в год, цена одного номера—3 руб. 30 коп.

РЕДКОЛЛЕГИЯ

УДК 577.112.3:616.858—008.6.615.21

ВЛИЯНИЕ КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ АНТИПАРКИНСАНТАМИ И АУТОГЕМОЛИКВОРОТРАНСФУЗИИ НА АКТИВНОСТЬ НЕПРОМЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ МОЗГА БОЛЬНЫХ ПАРКИНСОНИЗМОМ

ДАМБИНОВА С. А., БЫЧКОВ Е. Р., КРАСНОВА И. Н.,
ШЕВЧЕНКО К. А., КОРОЛЬКОВ А. В.

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Исследовали содержание основных метаболитов дофамина и серотонина—гомо-ванилиновой кислоты и 5-гидроксинидолуксусной кислоты, глутамата и ГАМК в СМЖ больных паркинсонизмом. На фоне комплексной терапии антипаркинсантами и при аутогемоликворотрансфузии (введение низкомолекулярных пептидов с ГАМК- M_r 2500 Д, выделенных из собственной плазмы, в СМЖ больных) обнаружены различные изменения содержания указанных веществ в ликворе. Показано, что ответная реакция организма на применение фармакологических препаратов выражалась в корреляции ГАМК- и дофаминергической систем. Вместе с тем, терапевтическое действие антипаркинсантов сопровождалось снижением активности серотонинергической системы мозга. Лечебный эффект аутогемоликворотрансфузии приводил к аналогичной нормализации ГАМК- и дофаминергической систем. Однако угнетения серотонинергической системы мозга не происходило. Полученные данные свидетельствуют об эффективности применения низкомолекулярных пептидов для коррекции пораженных медиаторных систем мозга при лечении двигательных расстройств.

Деструктивные поражения ЦНС различной этиологии широко распространены и ведут, как правило, к нарушению двигательных функций и стойкой инвалидности. Вместе с тем, медицина до сих пор не располагает эффективными средствами лечения этих поражений, поскольку все еще мало изучены патогенетические механизмы их возникновения.

В настоящее время показано, что эндогенные вещества пептидной природы играют важную роль в контроле двигательных функций у человека [1]. Более того, разработанный недавно Бехтеревой и соавт. [2] новый способ лечения больных паркинсонизмом на основе эндогенных пептидов, названный аутогемоликворотрансфузией (АГЛТ), дал весьма обнадеживающие результаты [3]. Суть данного метода сводится к тому, что пептидные фракции с $M_r \sim 2500$ Д, выделенные из собственной плазмы, вводятся в СМЖ больных с двигательными расстройствами [2]. Хороший лечебный эффект был получен у 37 больных паркинсонизмом, имеющих стойкую резистентность к фармакологической коррекции. Однако наблюдалась разная

продолжительность клинического эффекта у этих пациентов при АГЛТ. Очевидно, это связано с разной степенью коррекции пораженных медиаторных систем, включающихся в конкретные процессы патогенеза заболевания. В этой связи представляет интерес исследование влияния комплексной терапии антипаркинсонами и АГЛТ на активность нейромедиаторных систем мозга больных паркинсонизмом.

Известно, что в развитии симптомов данного заболевания большое значение имеет нарушение обмена дофамина (ДА), норадреналина (НА), серотонина (5-ОТ), ГАМК и АХ [4]. Так, при исследовании СМЖ больных паркинсонизмом обнаружено снижение концентрации гомованилиновой кислоты (ГВК), главного метаболита ДА [5], и концентрации ГАМК [6]. Относительно уровня 5-оксиндолоуксусной кислоты (5-ОИУК), главного метаболита 5-ОТ, существуют противоречивые данные. Описано снижение его содержания [7] или показано наличие на уровне контроля [8].

Поскольку в терапии двигательных расстройств широко используются лекарственные препараты, содержащие L-ДОФА в комбинации с другими компонентами, воздействующими непосредственно на медиаторный метаболизм, нами была произведена оценка влияния комплексной терапии антипаркинсонами и АГЛТ на активность дофамин-, серотонин-, ГАМК- и глутаматергической систем мозга у больных паркинсонизмом.

Материалы и методы

Обследован 21 больной паркинсонизмом в возрасте от 47 до 56 лет, длительность заболевания составляет от 2 до 10 лет. Пациенты получали следующую лекарственную терапию: наком, мадопар, циклодол, мидантан. Контрольная группа состояла из 10 лиц с неврологической патологией, не связанной с экстрапирамидными расстройствами: нарушение мозгового кровообращения, остеохондроз позвоночника в возрасте от 42 до 55 лет. СМЖ забирали по медицинским показаниям в утренние часы посредством люмбальной пункции. Пробы хранили при -40° , до выполнения анализа. АГЛТ у больных паркинсонизмом проводили на основании Разрешения Президиума УМС МЗ СССР от 24 декабря 1987 г. Для проведения этой процедуры брали сыворотку крови больного, предварительно обработанную одним из методов: ультрафильтрацией через фильтр РМ 10 («Amicon», Голландия) или гель-фильтрацией на колонке с сорбентом Sephadex G-50 «Fine Pharmacia» (Швеция). АГЛТ выполняли эндолюбальным введением компонентов, полученных после подобной обработки.

Концентрации ГВК, 5-ОИУК и нейромедиаторных аминокислот определяли ВЭЖХ с электрохимическим детектором. Хроматографическая система состояла из насоса модели 305 Gilson, инжектора Rheodyne, металлической колонки (4,6×250 мм) с обращеннофазным сорбентом Partisil 5 ODS 3, предколонки и ампер-

метрического детектора LC-4В. Измерение ГВК и 5-ОИУК проводили при потенциале стеклоуглеродного электрода + 0,75 В относительно хлорсеребряного электрода сравнения. Подвижная фаза состояла из 0,02 М цитрат-фосфатного буфера, 0,002 М Na₂ ЭДТА 0,004%-ного октисульфата натрия, 10%-ного метанола, скорость потока—1 мл/мин. Концентрации ГВК и 5-ОИУК в СМЖ определяли прямым вводом образца в хроматографическую систему после добавления к нативному ликвору равного объема 0,1 М хлорной кислоты. Для измерения уровней ГАМК и глутамата в СМЖ использовали металлическую колонку (1×250 мм) с сорбентом Partisil 10 ODS 3 при потенциале стеклоуглеродного электрода +0,7 В. Подвижная фаза состояла из 0,1 М NaH₂PO₄, 0,001 М Na₂ ЭДТА, 2%-ного тетрагидрофурана и 39%-ного метанола. Скорость потока элюента—0,2 мл/мин. Предколонночную модификацию аминокислот проводили при помощи ортофталесового альдегида по методу Peinado и соавт. [9].

Полученные данные обработаны при помощи корреляционного анализа, достоверность различий между группами определяли по критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Концентрации ГВК, 5-ОИУК, ГАМК и глутамата в СМЖ у пациентов контрольной группы и больных паркинсонизмом представлены в табл. 1. Полученные нами средние значения содержания метаболитов моноаминов и нейромедиаторных аминокислот в СМЖ согласуются с имеющимися в литературе данными [10, 11]. Отмечается

Таблица 1
Содержание гомованилиновой, 5-оксинидолуксусной кислот, ГАМК и глутамата в СМЖ больных паркинсонизмом (нмоль/мл)

Группа обследованных пациентов	Соединения			
	гомованилино- вая кислота	5-оксинидолук- сусная кислота	ГАМК	глутамат
Контрольная группа (n=10)	0,153±0,021	0,114±0,013	3,84±0,66	1,89±0,38
Больные паркинсонизмом (n=21)	0,123±0,016	0,071±0,005 P<0,05	2,59±0,24	1,81±0,11

достоверное снижение уровня 5-ОИУК, основного метаболита 5-ОТ, в СМЖ у больных паркинсонизмом на фоне проводимой лекарственной терапии (61% от контрольной группы). Это может быть обусловлено антагонистическими взаимодействиями препаратов L-ДОФА и серотонинергической системы мозга. Показано, что введение L-ДОФА снижает содержание 5-ОТ в мозгу [12] и 5-ОИУК в ликворе [13]. Концентрация ГВК, основного метаболита ДА, и ГАМК у больных составляет соответственно 80 и 67% от контрольной груп-

ты, но эти изменения статистически не достоверны. Известно, что во время лечения L-ДОФА отмечается повышение уровня ГВК, сниженного у больных паркинсонизмом в СМЖ [13]. Показано, что препараты L-ДОФА повышают активность глутаматдекарбоксилазы — фермента, синтезирующего ГАМК из глутамата и базальных ганглиях [14], также отмечено, что терапия L-ДОФА значительно увеличивает пониженную концентрацию ГАМК в СМЖ у больных паркинсонизмом [15]. В табл. 2 представлены коэффициенты корреляции между уровнями моноаминов и нейротрансмиттерных аминокислот, которые характеризуют степень взаимодействия нейромедиаторных систем мозга. Отмечается высокая корреляция между содержанием ГВК и 5-ОИУК в СМЖ у пациентов контрольной группы. Известно, что между дофамин- и серотонинергическими системами

Таблица 2

Корреляция между уровнями гомованилиновой, 5-оксиндолуксусной кислот, ГАМК и глутамата в СМЖ больных паркинсонизмом

Группа обследованных пациентов	Соединения					ГАМК глутамат
	5 оксин- долуксусная кислота гомованили- новая кислота	5 оксин- долуксус- ная кислота ГАМК	5-оксин- долуксусная кислота глутамат	гомовани- линовая кислота ГАМК	гомовани- линовая кислота глутамат	
Контрольная группа (n=10)	0.932	-0.508	-0.746	-0.593	-0.602	0.552
Больные паркинсонизмом (n=21)	0.618	0.550	0.652	0.553	0.373	0.517

существуют тесные нейроанатомические [16], биохимические и функциональные связи [17]. У больных паркинсонизмом, несмотря на проводимую терапию, отмечаются значительные изменения коэффициентов корреляции как по величине, так и по знаку, что свидетельствует о глубоком нарушении нейромедиаторного взаимодействия при этой патологии.

Данные о содержании ГВК, 5-ОИУК, ГАМК и глутамата в СМЖ больных паркинсонизмом разной степени тяжести на фоне проводимой терапии представлены в табл. 3. Сравнительный анализ полученных результатов показывает, что на поздних стадиях заболевания

Таблица 3

Содержание гомованилиновой, 5-оксиндолуксусной кислот, ГАМК и глутамата в СМЖ больных с разной степенью тяжести паркинсонизма (нмоль/мл)

Группа обследованных пациентов	Соединения			
	гомованили- новая кис- лота	5 оксин- долуксусная кислота	ГАМК	глутамат
Больные I—II стадия паркинсонизма (n=4)	0,084±0,027	0,663±0,011	2,31±0,28	1,60±0,25
Больные III—IV стадия паркинсонизма (n=9)	0,134±0,119	0,074±0,011	2,69±0,44	1,92±0,16

при использовании лекарственной терапии не происходит достоверных изменений в содержании 5-ОИУК, ГАМК и глутамата по сравнению с ранними стадиями паркинсонизма. Отмечается более низкий уровень ГВК у больных с I—II стадиями заболевания по сравнению с контролем и группой больных паркинсонизмом III—IV стадии. Очевидно, низкая концентрация ГВК в СМЖ при начальных стадиях заболевания связана с меньшей степенью дегенерации дофаминергических нейронов в черной субстанции, что позволяет использовать ма-

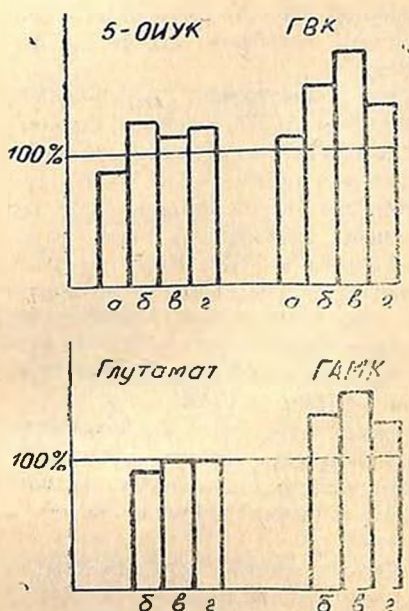


Рис. Влияние аутогемоклыворотрансфузии на изменение уровней ГАМК, гомованилиновой, 5-оксиндоуксусной кислот, ГАМК и глутамата в СМЖ у больных паркинсонизмом. а—г—больные паркинсонизмом; по оси ординат—отклонение в % уровней 5-ОИУК, ГВК, ГАМК и глутамата в СМЖ больных паркинсонизмом после проведения АГЛТ к уровням этих соединений до АГЛТ.

лые дозы препаратов L-ДОФА при значительном улучшении состояния больного.

Таким образом, комплексная терапия антипаркинсониками нормализует нейромедиаторный дисбаланс при паркинсонизме, в частности дофаминергической и ГАМК-ергической систем мозга; одним из побочных эффектов данной терапии является снижение активности серотонинергической системы мозга человека.

При применении АГЛТ наиболее выраженные клинические эффекты наблюдали у больных паркинсонизмом с ригидной и акинетико-ригидной формами заболевания и с низким уровнем 5-ОИУК и ГВК в СМЖ. Лечебный эффект у этой категории больных отмечался спустя 1—6 ч после АГЛТ и выражался в резком снижении ригидности, брадикинезии, улучшении поструральной устойчивости, походки и в меньшей степени—в уменьшении тремора. Кроме того, у пациентов отмечалось оживление мимики, улучшение настроения и

речевой функции. Тремор у больных с преимущественно дрожательными формами заболевания менее всего подвергался регрессу под воздействием АГЛТ; в этом случае распад тремора происходил начиная с дистальных отделов конечностей. Улучшение клинического состояния наблюдалось от 1—2 недель до полугода. При наличии положительного лечебного эффекта от первичного введения ультрафильтрата в дальнейшем для его закрепления использовали эндолумбальное введение очищенных с помощью гель-фильтрации пептидных фракций. В случае, если эти фракции вводили совместно с белковым стабилизатором (аутоальбумином), лечебный эффект от введения АГЛТ существенно удлинялся.

На рисунке представлены изменения концентраций ГВК, 5-ОИУК, ГАМК и глутамата в СМЖ после проведения АГЛТ у четырех больных паркинсонизмом с выраженным длительным лечебным эффектом. Оказалось, что у больных с акинетико-ригидной формой II—III стадии наблюдается значительное увеличение концентрации ГВК (на 60, 89 и 38%) у каждого из выбранных пациентов, а также отмечается повышение уровня ГАМК (на 39, 61 и 25%). В то же время колебание уровней 5-ОИУК и глутамата незначительно и не превышает 20%. Эти изменения сходны по направленности с влиянием лекарственной терапии, однако в отличие от препаратов L-ДОФА, оказывающих супрессирующее действие на серотонинергическую систему мозга, АГЛТ не снижает содержания 5-ОИУК в СМЖ.

Таким образом, можно предположить, что одним из возможных путей реализации положительного клинического эффекта данного метода лечения является стимулирующее влияние эндогенных пептидов на метаболизм в дофамин и ГАМК-ергических нейронах мозга.

THE INFLUENCE OF COMPLEX THERAPY BY ANTIPARKINSONIAN DRUGS AND THE AUTOHAEMOLIQUROTRANSFUSION ON THE ACTIVITY OF NEUROTRANSMITTER SYSTEMS IN THE BRAINS OF PATIENTS WITH PARKINSON'S DISEASE

DAMBINOVA S. A., BYCHKOV E. R., KRASNOVA I. N., SHEVCHENKO K. A., KOROLKOV A. V.

Scientific Research Institute for Experimental Medicine, USSR Academy of Medical Sciences, Leningrad

The content of main metabolites of dopamine (DA) and serotonin (5-HT), homovanillic and 5-hydroxyindoleacetic acid, Glu and GABA were measured in cerebrospinal fluid (CSF) of patients with Parkinson's disease. Various changes in the content of this substances in CSF were revealed against a background of the complex therapy by antiparkinsonian drugs and autohaemoliqurotransfusion (AHLT). This procedure includes introduction of low mol. weight (< 2500 Da) peptides, obtained from the patients plasma, in to their CSF. It was shown, that the pharmacological treatment stimulated the activity DA- and GABA-ergic brain

systems and suppressed 5-HT-ergic system. AHLT caused the analogous improvement of DA- and GABA-ergic activity, but had not any influence upon the 5-HT system. The data obtained testify that the low molecular weight peptides may be used for the pharmacological corrections of the neurotransmitter systems activity during the movement disorders treatment.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бехтерева Н. П. Здоровый и больной мозг человека. Л., Наука, 1988.
2. Бехтерева Н. П., Гурчин Ф. А., Дамбинова С. А., Корольков А. В., Корешонков О. Н., Нарышкин А. Г. Физиология человека, т. 13, № 3, с. 500—502, 1987.
3. Нарышкин А. Г., Гурчин Ф. А., Дамбинова С. А., Корольков А. В., Корешонков О. Н. — В кн.: Тезисы симпозиума «Физиология пептидов», Л., Изд-во АН СССР, с. 132—133, 1988.
4. Пикок К. — В кн.: Нейротрансмиттерные системы (под ред. Н. Дж. Легга), с. 102—117, М., Медицина, 1982.
5. Noir A. T. B., Ashcroft G. W., Crawford T. B. B. Brain, v. 92, p. 357—359, 1970.
6. Manyam B. V. Archives of Neurology, v. 39, p. 391—393, 1982.
7. Johansson B., Roos B.—E. Life Sci., v. 6, p. 1449—1454, 1967.
8. Chase T. N. Archives of Neurology, v. 27, p. 354—356, 1972.
9. Parado J. A., Athanas K. T., Ayers R. D. J. Neuroscience Methods, v. 18, p. 269—276, 1986.
10. Bowers M. B. Neuropharmacology, v. 11, p. 101—104, 1972.
11. Lakke J. P. W. F., Teelken A. W. Neurology, v. 26, p. 489—493, 1976.
12. Commisong J. W., Sedgwick E. M. Life Sci., v. 25, p. 83—85, 1979.
13. Петелин Л. С., Котенева В. М. Патохимические основы лечения паркинсонизма. М., Изд-во ВНИИМИ МЗ СССР, 1975.
14. Hornykewicz O., Lloyd K. G., Davidson L.—in: GABA in Nervous System Function (eds. Roberts E., Chase T. N., Towers T. B.) p. 449—485, Raven Press, New York, 1976.
15. Manyam B. V., Ferraro T. N., Hare T. A. Archives of Neurology, v. 45, p. 48—50, 1988.
16. Jacobowitz D. M. Monoaminergic pathway in central nervous system in: Psychopharmacology: A generation of progress. N. Y., p. 119—147, 1978.
17. Korsgaard S., Gerlach J., Christensson E. Eur. J. Pharmacol. v. 18, p. 245—246, 1985.

Поступила 4. I. 1991

УДК 616—009.24;616.831;616.092.9

СВЯЗЫВАНИЕ ГАМК И ДИАЗЕПАМА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС ЛИНИИ КРУШИНСКОГО-МОЛОДКИНОЙ, ГЕНЕТИЧЕСКИ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННЫХ К АУДИОГЕННЫМ СУДОРОЖНЫМ ПРИПАДКАМ

ЖУЛИН В. В., *ПЛЕСКАЧЕВА М. Г.

Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва *МГУ

У крыс-самцов линии *Крушинского-Молодкиной* (КМ), выведенных на способность к аудиогенным припадкам клонико-тонического типа, изучали состояние ГАМК и бензодиазепиновых рецепторов в теменной коре, мозжечке, стволе мозга. Активность рецепторов оценивали через сутки после однократного тестирования крыс в камере со звонком (120 дБ). Показатели крыс линии КМ сравнивали с данными контрольных беспородных самцов, у которых отсутствовала аудиогенная эпилептиформная реакция. Показано, что у крыс линии КМ снижено специфическое связывание $[^3H]$ дiazепама и $[^3H]$ ГАМК в мозжечке и коре. В стволе мозга пониженное связывание отмечено только для $[^3H]$ дiazепама. Дополнительная процедура вытеснения $[^3H]$ ГАМК немеченой ГАМК в коре мозга показала сходный характер вытеснения для обеих групп крыс. Это позволяет предположить, что пониженный уровень связывания в данном случае обусловлен уменьшением количества мест связывания.

Обсуждается возможная роль генетически закрепленного дефицита активности ГАМК и бензодиазепиновых рецепторов в качестве одной из причин повышенной судорожной готовности крыс линии КМ.

Аудиогенные судороги у грызунов—одна из известных экспериментальных моделей изучения механизмов эпилепсии [1, 2]. Специально выведенные на повышенную чувствительность к звуку крысы линии *Крушинского-Молодкиной* (КМ) [3, 4], дающие быстровозникающие и сильные припадки клонико-тонического типа могут быть удобным объектом, в частности для исследования генетически закрепленного нейрохимического комплекса, ответственного за генез судорожных состояний.

Существует гипотеза, согласно которой одной из причин возникновения различного типа эпилептиформных припадков является изменение состояния тормозных функций мозга [5, 6]. Эта гипотеза в определенной степени подтверждается экспериментальными данными об изменении в состоянии ГАМК-ергической системы мозга предрасположенных к аудиогенной эпилепсии животных [1, 2].

Одним из существенных звеньев ГАМК-ергической системы мозга являются ГАМК рецепторы, сопряженные с бензодиазепиновыми (БД) рецепторами и связанные с функционированием хлорного канала [7]. Исследование ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса животных, предрасположенных к аудиогенным судорогам,

может также дать ценную информацию для уточнения механизма противосудорожного действия бензодиазепинов.

Учитывая вышесказанное, в настоящей работе изучали связывание [^3H]ГАМК и [^3H]дiazепама с синаптическими мембранами различных отделов мозга крыс линии КМ.

Методы исследования

Интактных крыс-самцов линии КМ, выведенных в МГУ, или беспородных белых крыс-самцов в возрасте 6 недель (средняя масса 230 ± 12 г) помещали в камеру ($30 \times 45 \times 55$ см) с электрическим звонком, прикрепленным к потолку и обеспечивающим силу звука 120 дБ. Регистрировали латентный период начала двигательного возбуждения, длительность фазы двигательного возбуждения, время наступления и длительность развития судорог, а также степень припадка, которую оценивали по четырехбальной шкале [3]. Время наблюдения ограничивали 1 мин.

Через сутки крыс декапитировали при помощи пильотины, извлекали головной мозг и на холоде отделяли ствол мозга с верхними и нижними бугорками четверохолмия, мозжечок и теменную кору. Ткань гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе Поттера в 10 мл среды выделения (0,32 М сахарозы, 0,05 М трис HCl , 0,001 М ЭДТА, pH 7,4) при 4° . Гомогенат центрифугировали при 1000 g 10 мин, осадок отбрасывали, а супернатант вновь центрифугировали при 20000 g 20 мин. Супернатант сливали, а осадки грубых синаптических мембран P_2 замораживали на ночь при -40° . Затем осадки суспендировали в 10 мл 50 мМ трис HCl , pH 7,4, центрифугировали при 20000 g 20 мин, разводили осадки в 5 мл 50 мМ трис HCl , pH 7,4 и замораживали гомогенаты на ночь при -40° . Размороженные гомогенаты вновь тщательно гомогенизировали. К 0,1 мл водного раствора [^3H]дiazепама (74 Ки/ммоль, «Amersham», Англия, конечная концентрация в пробе 4,88 нМ) добавляли 0,4 мл суспензии синаптических мембран. Инкубацию проводили в течение 30 мин при 4° . Затем инкубационную смесь фильтровали под вакуумом через стекловолокнистый фильтр GF/C («Whatman», Англия) в течение 1 с и четырежды промывали фильтр 2 мл 50 мМ трис HCl , pH 7,4 при 4° . Высушенный фильтр помещали в сцинтилляционный флакон с 7 мл ЖС-8 («Реахим», СССР) и просчитывали на сцинтилляционном счетчике «Rackbeta» («ЛКВ», Швеция). Неспецифическое связывание определяли в присутствии $0,4 \cdot 10^{-6}$ М 7-бром-десметилдiazепама. Каждая проба общего и неспецифического связывания выполнена в двух параллелях. Количество белка определяли по Lowry и соавт. [8]. Определяли уровень специфического связывания как разность общего и неспецифического связывания. Рассчитывали удельный показатель специфического связывания на 1 мг белка.

Остаток гомогенатов синаптических мембран был заморожен на ночь при -40° . К оттаявшим гомогенатам (3,4 мл) добавляли 8 мл 0,02%-ного тритона X-100 в 50 мл 50 мМ трис- HCl pH 7,4 и инкуби-

ровали 20 мин при 37°, затем смесь центрифугировали при 20000 g 20 мин при 4°, супернатант сливали, и замораживали осадки на ночь при -40°. Оттаявшие осадки суспендировали в 3 мл 50 мМ трис-HCl pH 7,4 при 4°. К 0,1 мл водного раствора [³H]ГАМК («Изотоп», Ленинград; конечная концентрация в пробе 37,1 нМ) добавляли 0,4 мл синаптических мембран и инкубировали 30 мин при 4°. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 10⁻³ М ГАМК. Остальные параметры процесса и расчеты были такие же, как при связывании [³H]диазепама.

Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента. Ранговые корреляции рассчитывали по Спирмену.

Результаты исследования

Среднее значение латентного периода наступления волны двигательного возбуждения от начала действия аудиогенного раздражителя у крыс-самцов линии КМ (среднее из 10) было $3,3 \pm 0,5$ с; продолжительность двигательного возбуждения— $5,2 \pm 0,7$ с; длительность припадка от 2- до 3-й степени— $5,2 \pm 0,7$ с; время от начала действия раздражителя до максимального развития судорог $15,5 \pm 0,9$ с (табл. 1). У всех 10 крыс линии КМ зарегистрированы выраженные клонико-тонические судороги 3- или 4-й степени. Ни одна из 10 контрольных крыс не дала судорог и реакций двигательного возбуждения.

Таблица 1
Показатели развития аудиогенной судорожной реакции у крыс-самцов линии КМ

№	I, с	II, с	III, с	IV, с	Степень припадка
1	5	6	3	14	3
2	2	4	4	13	4*
3	2	3	4	12	4*
4	2	4	5	14	4*
5	6	8	5	19	3
6	5	10	5	20	3
7	4	5	10	19	3
8	3	4	5	14	4*
9	2	4	3	14	4
10	2	4	8	15	4*

Примечание. I—время от начала действия звукового раздражителя до начала двигательного возбуждения; II—длительность фазы двигательного возбуждения; III—длительность развития припадка от 2- до 3-й степени; IV—время от начала действия звукового раздражителя до момента максимального развития судорог. 3—тоническое напряжение туловища и передних конечностей, переворачивание крысы набок, подергивания задних лапок; 4*—почти полное тоническое напряжение за исключением задних конечностей; 4—полное тоническое напряжение с вытягиванием передних и задних конечностей.

Связывание [³H]диазепама с синаптическими мембранами у крыс линии КМ было снижено по отношению к показателям контрольных крыс во всех исследованных отделах мозга (табл. 2). Наибольшие различия отмечены в мозжечке (28,5%) и стволе мозга (22,2%), однако и в коре больших полушарий мозга за счет чрезвычайно низ-

ких коэффициентов вариабельности рядов (7 и 4%) различия достоверны (7,1%).

Как и в случае связывания [^3H]диазепама, связывание [^3H]ГАМК у крыс линии КМ в наибольшей степени отличалось от контрольных животных в мозжечке (—36,9%). Более низким у крыс линии КМ был и уровень связывания [^3H]ГАМК в коре мозга (18,5%). В стволе мозга по этому показателю различий обнаружено не было.

Таким образом, общей характерной чертой крыс линии КМ является пониженный уровень связывания ГАМК и БД рецепторов в различных отделах головного мозга, что и служит, вероятно, одной из существенных причин низкой эффективности соответствующих тормозных систем. Безусловно, используя суммарный показатель—уровень связывания, нельзя однозначно определить, какой параметр изменен: количество доступных мест связывания, их аффинность или то и другое вместе. Если учитывать известные данные о гетерогенности БД рецепторов (высоко- и низкоаффинные БД рецепторы

Таблица 2

Показатели связывания [^3H]диазепама и [^3H]ГАМК с синаптическими мембранами мозга беспородных крыс и крыс линии Крушинского-Молодкиной

Г р у п п а	Специфическое связывание (фмоль/мг белка)					
	[^3H]диазепам (4,83 нМ)			[^3H] ГАМК (27,1 нМ)		
	ствол	мозжечок	кора	ствол	мозжечок	кора
Беспородные крысы-самцы (n=10)	343,45±14,97	422,04±15,76	726,34±16,05	256,32±15,75	1131,81±28,33	(53,14±29,36)
Крысы самцы линии КМ (n=10)	298,31±13,02**	301,88±23,04**	674,78±9,88*	261,02±18,31	714,24±33,32**	534,18±29,82*

Примечание. n—количество животных; *p<0,01, **p<0,001 по отношению к группе беспородных крыс.

«центрального» и «периферического» типа, [9]) и ГАМК рецепторов (высоко- и низкоаффинные ГАМК_A рецепторы и ГАМК_B рецепторы, [10]), ответ на этот вопрос требует дополнительных экспериментов, однако мы сделали первый шаг в этом направлении, исследуя вытеснение [^3H]ГАМК из мембран коры линейных и беспородных крыс различными концентрациями немеченой ГАМК. Несмотря на значительные различия в абсолютных показателях связывания, графики вытеснения [^3H]ГАМК немеченой ГАМК, представленные в относительных величинах (% ингибирования), для обеих групп животных практически совпали (рис. 1). Этот факт свидетельствует о том, что пониженный уровень связывания [^3H]ГАМК в коре крыс линии КМ обусловлен, по-видимому, изменением не количества, а количества доступных для [^3H]ГАМК мест связывания.

Внутри каждой группы животных рассчитывали корреляции

между показателями связывания. У беспородных крыс в стволе мозга связывание [^3H]диазепама коррелирует с связыванием [^3H]ГАМК ($r=0,745$); связывание [^3H]диазепама в стволе мозга коррелирует со связыванием [^3H]ГАМК в мозжечке ($r=0,648$); обратной корреляцией связаны показатели связывания [^3H]ГАМК в стволе мозга и [^3H]диазепама в мозжечке ($r=-0,624$). Ни одна из описанных корреляций не обнаружена в группе крыс КМ, однако у этих животных, коррелирует связывание [^3H]диазепама в мозжечке и коре ($r=-0,683$). Не вдаваясь в детальный анализ корреляций, можно констатировать, что корреляционные соотношения между показателями связывания [^3H]диазепама и [^3H]ГАМК у крыс КМ значительно отличаются от таковых у крыс, резистентных к аудиогенному раздражителю.

На заключительном этапе работы были рассчитаны корреляции между показателями развития судорожного припадков и связыванием [^3H]диазепама и [^3H]ГАМК у крыс линии КМ. Из всех рассчитанных корреляций лишь одна оказалась достоверной: связывание [^3H]ГАМК в мозжечке коррелирует с длительностью развития припадков от 2- до 3-й степени (табл. 1) ($r=0,691$).

Обсуждение результатов

Следует отметить, что единственными критериями подбора животных для опыта были возраст и масса. Учитывая, что все крысы линии КМ в ответ на аудиогенный раздражитель в 100% случаев дали судороги, а беспородные белые крысы не дали судорог вообще, можно условно считать, что исследовались фенотипически противоположные популяции животных: предрасположенные и неперепредрасположенные к аудиогенным судорогам. При кардинальном различии реакций на звук сравниваемые группы животных значительно отличались друг от друга и по состоянию тормозных систем мозга, а именно: у крыс линии КМ понижено связывание меченых ГАМК и диазепама, что может в какой-то степени свидетельствовать об уменьшении эффективности использования ГАМК и БД рецепторов.

По современным представлениям, аудиогенные судороги у грызунов связаны, главным образом, с судорожной активностью стволовых и подкорковых образований, в основном продолговатого мозга и нижнего двухолмия [5, 11]. Нами показано, что у крыс линии КМ уровень связывания [^3H]диазепама в препарате, состоящем из мембран клеток ствола мозга и пластинки крыши, достоверно снижен. По-видимому, у крыс линии КМ пониженный уровень связывания [^3H]диазепама в данном препарате обусловлен изменением БД рецепторов, локализованных в верхнем двухолмии. На это указывают данные о высокой плотности ГАМК и БД рецепторов в этой структуре, так как аналогичные показатели для нижнего двухолмия и продолговатого мозга весьма малы [12].

Известно, что другая из изучаемых нами структур—мозжечок характеризуется самой высокой плотностью ГАМК рецепторов всех

типов и средней плотностью БД рецепторов «центрального» типа [12]. Важно отметить, что из трех изученных отделов мозга крыс линии КМ именно в мозжечке обнаружено максимальное отличие от контрольных животных—снижение уровня связывания [^3H]ГАМК и особенно [^3H]диазепама. Тормозное влияние этой структуры на развитие припадков показано в экспериментах, что позволяет рассматривать мозжечок в качестве «антисистемы», то есть одной из структур, функционирование которых подавляет патологическую гиперреактивность мозга [13]. Обнаруженная нами положительная корреляция длительности развития припадков и показателей связывания [^3H]ГАМК в этой структуре также свидетельствует об участии мозжечка в механизмах торможения судорожной реакции. Характерно также, что выявленные у резистентных к судорогам крыс взаимосвязи между показателями связывания [^3H]ГАМК и [^3H]диазепама, относящиеся к мозжечку, отсутствуют у крыс линии КМ.

Особый интерес вызывают отличия по связыванию [^3H]ГАМК и [^3H]диазепама, обнаруженные в теменной коре крыс линии КМ. В литературе имеются единичные и противоречивые данные по состоянию ГАМК и БД рецепторов у чувствительных к звуковому раздражителю крыс и мышей. Полученные нами результаты о значительном снижении показателей связывания [^3H]ГАМК и небольшом уменьшении связывания [^3H]диазепама отчасти подтверждают данные об уменьшении плотности соответствующих рецепторов у мышей [14, 15]. В то же время исследования, проведенные на отличной от нашей линии крыс, генетически предрасположенных к аудиогенным судорогам (GEPR—Genetically Epilepsy-Prone Rats [2]), показали увеличение по сравнению с контролем числа доступных мест связывания для [^3H]мусцимола и незначительное увеличение аналогичного показателя для [^3H]флуниотразепама [16]. Эти расхождения с полученными нами данными могут быть вызваны рядом методических различий. В частности, отметим, что авторы вышеупомянутой работы, в отличие от нас, для оценки ГАМК рецепторов использовали [^3H]мусцимол. В настоящее время стало известно, что [^3H]мусцимол помимо ГАМК рецепторов связывается с другими участками клеточной мембраны [17], то есть повышение связывания, обнаруженное ими, может быть обусловлено не только реакцией с ГАМК рецепторами.

Суммируя полученные нами данные, можно заключить, что крысы линии КМ, предрасположенные к аудиогенным судорогам, видимо, отличаются значительным нарушением функционирования тормозной ГАМК-ергической системы мозга. Для данной линии крыс это выражается в уменьшении связывания [^3H]ГАМК в ряде структур мозга, а также в обнаруженном другими авторами увеличении содержания ГАМК в мозгу этих крыс [18]. Существующие данные о том, что системное введение крысам линии КМ ГАМК в больших дозах снижает в ряде случаев степень припадков, также косвенно свидетельствуют о дефектности ГАМК системы у крыс КМ [19]. Од-

нако неясно, как компенсирующее действие ГАМК в этом случае соотносится с приведенными выше данными о повышенном уровне этого медиатора в мозгу крыс КМ.

Дефектность ГАМК-ергической системы исследуемых крыс, вероятно, усиливается и за счет снижения связывающих параметров БД рецепторов. Как известно, бензодиазепины—экзогенные лиганды БД рецепторов—имеют выраженное противосудорожное действие [20]. У ряда бензодиазепинов, в частности диазепам, обнаружена почти стопроцентная корреляция между способностью купировать судороги и уровнем связывания с БД рецепторами мозга [21]. Кроме того, бензодиазепины облегчают и связывание ГАМК с ГАМК рецепторами и, таким образом, в определенной степени могут восстанавливать дефицит активности самой ГАМК-ергической передачи [7, 12].

В заключение следует отметить, что в механизме возникновения и развития аудиогенного судорожного припадка у грызунов существенную роль играют не только ГАМК-ергическая и связанная с ней БД система, но и другие комедиаторные системы, в частности моноаминергические, ацетилхолинергическая, глутаматергическая и др. системы [1, 2]. Конкретно для крыс линии КМ показана дефектность моноаминергических систем [22, 23], высокая активность АХЭ в коре мозга [24]. Однако не обнаружены различия по показателям связывания меченого глутамата у крыс линий КМ и *Wistar* [25]. Таким образом, генетическая предрасположенность к аудиогенным судорогам у животных определяется комплексом нейрохимических изменений, требующих, соответственно, и комплексного подхода к оценке наиболее вероятных механизмов генеза судорожной активности.

GABA- AND BENZODIAZEPINE RECEPTORS IN THE BRAIN OF KRUSHINSKY-MOLODKINA RATS GENETICALLY PRONE TO AUDIOGENIC SEIZURES

ZHULIN V. V., *PLESKACHEVA M. G.

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

*Moscow State University

GABA- and benzodiazepine receptors of neocortex, cerebellum and brainstem of Krushinsky-Molodkina (KM) rats bred on capacity to audiogenic seizures were studied. Binding parameters of these receptors were estimated in 24 hour after a single testing of rats in the box supplied with a bell (120 dB). Binding data of KM rats were compared with the data of control mongrel male rats which had not any audiogenic seizure reaction. It has been shown that specific binding of [3 H]diazepam and [3 H]GABA in neocortex and cerebellum of KM rats were diminished as compared with control ones. The decrease of specific binding in brainstem was found for [3 H]diazepam only. Using additional assay of [3 H]GABA binding inhibition by unlabelled GABA in neocor-

tex the decrease of specific binding caused by lowering of binding sites quantity has been defined. The deficiency of GABA- and benzodiazepine receptors binding capacity as one of the reasons of high seizure activity of KM rats is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Biziere K., Chambon J. P. *Rev. Neurol.*, v. 143, N 5, p. 329—340, 1987.
2. Fisher R. S. *Brain Res. Rev.*, v. 14, p. 245—278, 1989.
3. Крушинский Л. В. Формирование поведения животных в норме и патологии. М., МГУ, 1960.
4. Krushinsky L. V., Molodkina L. N., Fless D. A., Dobrokhotova L. P., Steshenko A. P., Semiokhina A. F., Zorina Z. A., Romanova L. G.—In: *Physiological effects of noise* (eds. B. L. Welch, A. S. Welch), New York, Plenum Press, p. 159—183, 1970.
5. Крушинский Л. В., Молодкина Л. Н., Флесс Д. А., Доброхотова Л. П., Стещенко А. П., Семиохина А. Ф., Зорина Э. А., Романова Л. Г., Цурита П. Эпилепсия (периодический бюллетень информационных и методических материалов проблемной комиссии по проблеме союзного значения «Эпилепсия»), Тбилиси, № 5, с. 37—49, 1972.
6. Аксентьев С. Б., Левинский М. В. *Журн. невропат. и психиатрии*, т. 90, вып. 1, с. 136—146, 1990.
7. Richards J. G., Mohler H. *Neuropharmacology*, v. 23, № 2B, p. 233—242, 1984.
8. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
9. Marangos P. J., Patel J., Clark-Rosenberg R. *Nol. Pharmacol.*, v. 22, N 1, p. 26—32, 1982.
10. Schoch P., Richards J. G., Haring P., Takacs B., Stahl C., Stachelin T., Haeufely W., Mohler H. *Nature*, v. 314, N 6007, p. 168—171, 1985.
11. Browning R. A. *Life Sci.*, v. 39, N 10, p. 857—867, 1986.
12. McCabe R. T., Wamsley J. K. *Life Sci.*, v. 39, N 21, p. 1937—1945, 1986.
13. Крыжановский Г. Н. Детерминантные структуры в патологии нервной системы: генераторные механизмы нейропатологических синдромов. М., Медицина, 1980.
14. Ticku M. K. *J. Neurochem.*, v. 33, p. 1135—1138, 1979.
15. Horton R. W., Prestwich S. A., Meldrum B. S. *J. Neurochem.*, v. 39, p. 864—876, 1982.
16. Booker J. D., Dailey J. W., Jobe P. C., Lanet J. D. *Life Sci.*, v. 39, N 9, p. 799—806, 1986.
17. Jr. P. M., Bashir-Elahi R., Chader G. J. *Neurochem. Int.*, v. 8, N 2, p. 233—237, 1986.
18. Логинова Г. А., Сергиенко Н. Г., Попова Л. Д. I съезд медицинских генетиков Укр. ССР: Тез. докл., Львов, с. 149—150, 1988.
19. Рябикская Е. А., Габидова Н. М. *Журн. высшей нервной деятельности*, т. 32, вып. 1, с. 47—53, 1982.
20. Левинский М. В. *Журн. невропатол. и психиатрии*, т. 89, вып. 6, с. 118—126, 1989.
21. Paul S. M., Syapin P. J., Paugh B. A., Moncada V., Scolnick P. *Nature*, v. 281, p. 688—689, 1979.
22. Долина С. А. *Журн. невропатол. и психиатрии*, т. 82, вып. 6, с. 40—45, 1982.
23. Сергиенко Н. Г., Логинова Г. А. *Вопр. мед. химии*, т. 29, № 6, с. 21—24, 1983.
24. Еремеев Н. С.—В кн.: *Генетика поведения*, Ленинград, Наука, с. 88—92, 1969.
25. Дамбинова С. А., Городинский А. И. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 94, № 2, с. 58—59, 1982.

Поступила 6. XI. 1990

УДК 612.82+577.12

ПРОБЛЕМНО-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ БАНК ДАННЫХ «ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕЖНЕЙРОНАЛЬНОЙ КОММУНИКАЦИИ В МОЗГУ» (РСВІС-91)

БУДАНЦЕВ А. Ю., ВАСИЛЬЧИКОВ В. В.

Институт теоретической и экспериментальной биофизики АН СССР, Пущино;
Библиотека естественных наук АН СССР, Москва

В статье изложена идея создания проблемно-ориентированного банка данных «Физико-химические основы межнейрональной коммуникации в мозгу» (РСВІС-91). На основе анализа литературы в состав такого банка включены 5 баз данных (БД): 1) «Слайс-90», «Локальная суперфузия мозга»; 2) «Биохимическая микроанатомия мозга»; 3) «Нейротрофические соединения в мозгу (биохимия, биологическая активность, физико-химические и молекулярные свойства); 4) «Молекулярная биология генома нервных клеток (роль генома в биосинтезе и секреции сигнальных нейроспецифических молекул)»; 5) «Физико-химическая патология межнейрональной коммуникации (физико-химические основы нервных и психических болезней человека)». Приведены форматы описания библиографических данных в БД «Слайс-90», «Локальная суперфузия мозга», которые реализуются в настоящее время.

Развитие компьютерных технических средств и разработка специального программного обеспечения (систем управления базами данных—СУБД) привели к широкому внедрению вычислительной техники в автоматизацию информационного поиска и обработки информационных источников и созданию специализированных (проблемно-ориентированных) банков данных, в том числе в различных областях общественных и естественных наук. Для примера можно привести ряд систем, функционирующих в США в области естественных наук и медицины: Research Information System, Inc.; система OPAC (Online Public Access Catalog, The Mount Sinai Medical Center, Inc.); Dialog Information Services, Inc.; National Library of Medicine (Medlars—Online Information Retrieval System); Compu Serve; Easinet—Telebase Systems, Inc.; BRIS Colleague Medical Search Service и др. В нашей стране также проводится работа по созданию больших автоматизированных информационно-поисковых систем в области научно-технической информации и разработке соответствующего программного обеспечения [1, 2].

В отличие от зарубежного опыта, разработка специализированных банков данных в области биологии и медицины в нашей стране находится в начальной стадии, хотя определенная работа в этом

направлении у нас проводится. Например, в нашем институте разработан фактографический банк данных по ферментам и метаболическим путям [3, 4], в Институте нормальной физиологии АМН СССР разрабатывается банк по нейропептидам [5, 6] и др. Учитывая тот факт, что современные компьютерные средства активно проникают в отечественные научные организации и соответственно активно начинают использоваться в экспериментальной работе, моделировании и обработке научной информации, в настоящее время становится актуальной следующая задача: *разработка принципов организации системы компьютерной обработки информации в области нейробиологии, в частности библиографической информации и одновременно создание отечественных специализированных (проблемно-ориентированных) баз и банков данных.*

Анализ ситуации

В течение последних лет нами предпринята попытка провести общий анализ тенденций развития физико-химической нейробиологии с целью определения наиболее перспективных направлений для начала разработки компьютеризированной системы обработки информационного материала для:

- автоматизации накопления и поиска необходимой библиографической информации в области физико-химической нейробиологии;
- ускорения составления аналитических обзоров по проблеме;
- разработки основного перечня баз данных, которые могли бы составить основу банка данных в области физико-химической и молекулярной нейробиологии.

Краткие результаты такого анализа приведены ниже.

Одна из центральных и фундаментальных проблем в области исследований мозга связана с изучением *нейрохимии и биофизики межнейрональной коммуникации в мозгу.*

Сигнальные молекулы, запускаящие каскад нейрохимических реакций и биофизических процессов в области синаптических и несинаптических контактов между нервными клетками в процессе их системной деятельности, являются «системообразующими факторами», которые играют определяющую роль в реализации интегративных функций мозга. Исследования в этой области, особенно в последние годы, представляют чрезвычайно важную комплексную научную проблему, имеющую большое фундаментальное и прикладное значение.

Предметом нейрохимии и биофизики межнейрональной коммуникации (включая взаимодействие нейронов и глии) является:

- биохимическое изучение структуры и физико-химических свойств сигнальных соединений, являющихся материальными переносчиками информации между нервными клетками (включая развитие методов поиска и выделения их из нервной ткани);
- изучение общеметаболических процессов, происходящих в нервных клетках, которые обеспечивают биосинтез сигнальных молекул, их секрецию и деградацию;

— функционально-нейрохимическое исследование высвобождения (секреции) сигнальных молекул из нервных клеток и специфической связи этого высвобождения (секреции) с функциональной активностью нервных клеток;

— биофизическое изучение поведения сигнальных молекул в межнейрональном пространстве: диффузия молекул, взаимодействие с химическими структурами межклеточного матрикса (коллагеном, ламинином и др.) и глialными клетками;

— исследование первичных механизмов взаимодействия (рецепции) сигнальных молекул с клетками-мишенями;

— разработка клеточных моделей для функционального тестирования сигнальных молекул, изучения процессов секреции и др. и поиск новых оригинальных методов физико-химического анализа межклеточных коммуникаций.

Решение конкретных задач в области нейрохимии и биофизики межнейрональной коммуникации, как видно из приведенного перечня, может быть достигнуто при комплексном использовании методов клеточной и молекулярной биологии, биоорганической химии, функциональной и классической нейробиохимии, биофизики, физиологии нервной клетки и молекулярной нейрофармакологии.

Важность и актуальность развития нейрохимии и биофизики межнейрональной коммуникации объясняется определяющим значением *организованной целенаправленной функциональной активности систем нейронов* во всех видах инстинктивной и разумной деятельности животных и человека.

Из приведенных кратких тезисов очевидно важное фундаментальное значение исследований нейрохимических и биофизических основ межнейрональной коммуникации для формирования крупных теоретических обобщений в следующих направлениях.

1. Роль сигнальных молекул межклеточной коммуникации в формировании НС и синаптогенезе.

2. Нейрохимические и биофизические основы морфо-функциональной «стабильности» и пластичности НС в процессе жизнедеятельности животных и человека в нормальных физико-химических условиях внешней среды и спасных для функций мозга.

3. Молекулярные процессы и соответствующие нейроактивные соединения, обеспечивающие межнейрональную коммуникацию при различных функциональных проявлениях интегративной деятельности ЦНС (поведение, обучение, эмоциональные реакции и т. д.).

4. Нейрохимические основы патологических состояний животных и человека, связанных с нарушением физико-химических процессов межнейрональной коммуникации. Научно обоснованный поиск новых фармакологических соединений для биохимической коррекции нарушенных функций мозга.

Исследования нейрохимических и биофизических основ межнейрональной коммуникации имеют ряд практических направлений, нап-

пример, в области медицины и фармакологии, как часть программы медико-биологических исследований психического здоровья человека.

СТРУКТУРА БАНКА ДАННЫХ «ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕЖНЕЙРОНАЛЬНОЙ КОММУНИКАЦИИ В МОЗГУ»

В рамках перечисленных в предыдущем разделе основных направлений развития проблемы межнейрональной коммуникации в мире и в нашей стране имеется обширная библиографическая информация в различных журналах, монографиях, сборниках и т. д. Наиболее серьезной работой по систематизации библиографической информации в области нейрохимии, и, в частности, в нейрохимии межнейрональной коммуникации можно считать два тома проблемно-ориентированного библиографического указателя, составленного Я. В. Белком [7, 8]. В этих указателях содержится 12296 библиографических описаний экспериментальных работ, обзоров и монографий в области нейрохимии с 1953 по 1967 гг. Детально разработанный им авторский и предметный указатели дают возможность эффективно использовать данные руководства в научной работе.

Для примера зарубежных публикаций в области обработки библиографической информации можно привести обзор по опиям пептидам и эндорфинам в развивающемся организме [9] и обзорные библиографические указатели по пептидам, подготовливаемые два раза в месяц Sheffield University Biomedical Information Service [10].

В последние годы в нашей стране, например, были созданы специализированные банки данных по природным регуляторным олигопептидам и белкам-регуляторам, рассчитанные на использование компьютерной техники [5, 6, 11].

На основании нашего анализа мы пришли к выводу, что фактографический банк данных «Физико-химические основы межнейрональной коммуникации в мозгу» (The Physical and Chemical Basis of the Interneuronal Communication in brain—PCBIC—91) должен включать как минимум следующие базы данных (БД).

1. БД «Слайс-90» и «Локальная суперфузия мозга». Эти базы данных должны содержать библиографические ссылки на работы, выполненные при помощи двух основных методов изучения секреции нейрореактивных сигнальных молекул: метода суперфузии переживающей нервной ткани *in vitro* и метода локальной суперфузии мозга *in vivo*.

2. БД «Биохимическая микроанатомия мозга» — распределение количественные данные о биохимических субстратах и процессах в морфологических структурах мозга.

3. БД «Нейротрофические соединения в мозгу, биологическая активность, физико-химические и молекулярные свойства».

4. БД «Молекулярная биология генома нервных клеток (роль генома в биосинтезе и секреции сигнальных нейроспецифических молекул)».

5. БД «Физико-химическая патология межнейрональной коммуникации (физико-химические основы первых и психических болезней человека)».

В 1989—1991 гг. мы начали разработку принципов и реализацию двух баз данных «Слайс-90» и «Локальная суперфузия мозга».

База данных «Слайс-90» (Slice-90)

БД «Слайс-90» содержит ссылки на все работы, выполненные с 1980 по 1990 гг. с использованием метода переживающих срезов нервной ткани *in vitro*: секрция нейроактивных сигнальных молекул; метаболизм в нервной ткани *in vitro*; скрининг и молекулярно-клеточные механизмы действия фармакологических соединений *in vitro*; рецепторы нейроактивных соединений; нейрохимия и биофизика регуляции метаболических процессов; электрофизиология; прижизненные исследования мембран нейронов, ионных каналов и др.

Первые работы с использованием переживающих срезов нервной ткани («Slice») появились в начале 50-х годов [12—17]. В последние годы вышло много обзоров по данной проблеме и два специальных сборника работ [18, 19].

На основе анализа публикаций мы сделали вывод, что темы многих работ закономерно повторяются с периодом каждые десять лет, например, глубокие и детальные исследования общеметаболических процессов в нервной ткани *in vitro*: дыхание, энергетика, синтез белков, обмен липидов и др. [20—22]. Естественно, что каждый раз новые экспериментальные работы «впитывали» в себя результаты работ, выполненных в предыдущие годы. В связи с этим мы пришли к заключению, что если собрать работы, выполненные на переживающих срезах в 1980—1990 гг., можно иметь довольно полную информацию о всех направлениях исследований в данной области экспериментальной нейробиологии.

Одно из ведущих направлений в нейробиологии, где активно используются переживающие срезы мозга, связано с нейрохимическими исследованиями секрции эндогенных нейроактивных соединений, в частности, сигнальных молекул межнейрональной коммуникации [23]. Можно утверждать, что метод суперфузии переживающих срезов мозга, наряду с использованием синапсом и нейросинапсом, является ведущим методом для изучения механизмов и систем регуляции секрции нейроактивных соединений *in vitro*.

Приведенные соображения определили содержание БД «Слайс-90».

Основу первой версии БД «Слайс-90» составляет файл, содержащий следующие поля:

AUTHOR — автор(ы) публикации,

TITLE — название работы,

PUBL — описание источника информации,

YEAR — год,

NCAT — порядковый номер в файле.

Ниже приведен фрагмент БД «Слайс-90», которая в настоящее

время содержит около 3 тыс. библиографических описаний монографий, обзоров, экспериментальных работ, выполненных с 1980 по 1990 гг.:

AUTHOR Flint R. S., Murphy J. M., Calkins P. M., McBride W. J.
TITLE Monoamine, amino acid and cholinergic interactions in
slices of rat cerebral cortex
PUBL Brain Res. Bull, v. 15, p. 197—202
YEAR 1985
NCAT 235

База данных «Локальная суперфузия мозга» (LSB)

БД «Локальная суперфузия мозга» содержит все работы, опубликованные с 1961 года (первая публикация), в которых использовались различные методы локальной суперфузии мозга: метод «push-pull»-капюли, микроанализ и др. Этот блок работ посвящен тем же направлениям экспериментальных исследований, которые перечислены в БД «Слайс-90», только выполненным *in vitro*.

В 1961 году появилась краткая публикация Gaddum [24], которая положила начало целому направлению в экспериментальной нейробиологии—локальной суперфузии мозга. Этот метод позволил впервые на целых животных в условиях *in vivo* изучать динамику секреции нейроактивных соединений в различных структурах мозга. В последующие годы метод Gaddum с нагнетательно-всасывающей капюлей («push-pull cannulae») был развит, появились новые подходы, один из главных получил название «микроанализ» [25, 26]. Круг задач, которые решаются при помощи локальной суперфузии мозга очень широк и охватывает изучение механизмов и регуляции секреции нейроактивных соединений *in vivo* в норме и при различных функциональных состояниях животных, изучение влияния на секрецию электростимуляции, различных фармакологических соединений и др.

БД «Локальная суперфузия мозга» состоит из трех файлов.

1. Основной файл—LSBA („LOCAL SUPERFUSION of BRAIN-A“) состоит из библиографических описаний публикаций по локальной суперфузии мозга с глубиной ретроспективы около 30 лет и фактографических данных, содержащихся в этих публикациях. Каждая публикация в БД LSBA представлена одной записью, состоящей из следующих полей:

AUTHOR автор (ы) публикации,
TITLE название работы,
PUBL описание источника информации,
YEAR год,
NCAT порядковый номер в файле,
CHAR PUBL вид публикации (обзор, тезисы, монография и т. д.),

METHOD	метод суперфузии,
ANIMAL	вид животного,
ZONE S	зона суперфузии,
MEDIUM	состав суперфузионной среды,
FLOW VEL	скорость суперфузии,
TIME S	время суперфузии,
VOLUME FR	объемы фракций суперфузата,
ANAL S	анализ суперфузата,
ADD ANAL	дополнительные методы анализа,
DEPT NSCI	область нейронаук
SUBJECT	краткое описание предмета исследования,
BRIEF SUM	краткие выводы,
ADD INF	дополнительная информация.

Типичное описание одной информационной единицы приведено ниже.

AUTHOR	Ajima A., Nakagawa T., Kato T.
TITLE	Simultaneous measurement of acetylcholine and dopamine release in rat striatum under freely moving conditions with a brain dialysis method
PUBL	J. Chromatography, v. 494, p. 297—302
YEAR	1989
NCAT	94
CHAR PUBL	Exper.
METHOD	Dialysis. Hollow fibers (C—DAK regenerated cellulose; Japan Medical Supply) with an outer diameter of 250 μ m and 90% cut-off of 5000 D were used to prepare a cannula as reported Life Sci., 35, 671, 1984
ANIMAL	Rat
ZONE S	Striatum (P 0-0; L 2-7; V 6-0) Stereotaxic atlas of König, Klippel (1963)
MEDIUM	mM: Na ⁺ /147; Ca ²⁺ /2.3; K ⁺ /4.0; Cl ⁻ /155.6; eserine 100 μ M; pH=6.0
FLOW VEL	2.6 mol/min
TIME S	6 h
VOLUME FR	52 mol
ANAL S	ACh and DA in dialysates were determined by HPLC with electrochemical detection (J. Chromatogr., 414 167, 1987)
ADD ANAL	No
DEPT NSCI	Neurochemistry, pharmacology
SUBJECT	Brain dialysis method completed with HPLC—ED with an enzyme-immobilized column can be employed to determine release ACh and DA in the striatum of freely moving rats
BRIEF SUM	The level of released ACh at 1 days after surgery was calculated to be 100%, the levels after 2, 3, 4 and 5

days were 95, 60, 35 and 25% respectively (the pores of dialysis tubes are clogged). 10^{-4} M nomifensine (DA-reuptake inhibitor) release of ACh and DA increased by 140 and 1800% resp. The effects of continuous perfusion of 10^{-4} M nomifensine were: ACh release temporarily increased to 140% and then decreased; the level of DA release increased 18-fold.

ADD INF Sterotaxic atlas and electrochemical detection see add. file SAB and ED

На начало 1991 года файл LSBA содержит около 500 описаний работ в области локальной суперфузии мозга.

2. Дополнительный файл—SAB („STEREOTAXIC ATLASSES of BRAIN») содержит библиографическое описание стереотаксических атласов мозга различных животных (формат описания см. БД «Слайс-90»). Организация файла SAB в БД LSB необходима потому, что реализация локальной суперфузии мозга в основном осуществляется при помощи стереотаксической техники. В настоящее время в этом файле содержится около 50 описаний стереотаксических атласов мозга крысы, кошки, кролика и других видов животных.

3. Особенно в последние годы локальная суперфузия мозга проводится совместно с электрохимическим анализом суперфузата [27, 28]. Кроме этого, прямая электрохимическая детекция ряда нейроактивных соединений с использованием вживленных в мозг графитовых электродов позволяет реализовать ряд задач, которые решаются методом локальной суперфузии мозга [29—31]. В связи с этим мы считаем, что локальная суперфузия мозга и прямая электрохимическая детекция ряда соединений являются в настоящее время основными методами изучения секреции сигнальных молекул в мозгу *in vivo*. Поэтому в БД LSB мы включили дополнительный файл ED («ELECTROCHEMICAL DETECTION»), который содержит библиографические описания работ по указанным двум направлениям электрохимического анализа в экспериментальной функциональной нейрхимии (формат описания см. БД «СЛАЙС-90»). В настоящее время файл ED содержит описания около 500 информационных единиц.

Заключение

Создание и развитие банка данных «Физико-химические основы межнейрональной коммуникации в мозгу» (PCBIC-91) с нашей точки зрения преследует две задачи:

а) дать импульс к планомерной разработке отечественной компьютеризированной проблемно-ориентированной информационной системы;

б) представить исследователям мощный современный инструмент для работы с текущей информацией в периодической научной

литературе. Базы данных «Слайс-90 и «Локальная суперфузия мозга» обеспечивают эффективный библиографический поиск необходимой информации по двум крупным методическим направлениям функциональной нейрохимии и физиологии мозга. Диалоговая работа с указанными БД может быть реализована средствами СУБД dBASE III Plus [32—33].

SPECIALIZED DATA BANC „PHYSICAL AND CHEMICAL BASIC OF INTERNEURONAL COMMUNICATION IN BRAIN (PCBIC—91)“

BUDANTSEV A. Yu., VASILCHIKOV V. V.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, USSR Academy of Sciences Puschino Library of Natural Sciences, Moscow

The idea of the specialized data bank „Physical and chemical fundamentals of interneuronal communication in brain (PCBIC—91)“ is discussed in the paper. Five data bases (DB) are described: (1) „Slice—90“, „Local superfusion of brain“; (2) „Biochemical microanatomy of brain“; (3) „Brain neurotrophic factors (biochemistry, biological activity, physico-chemical and molecular properties)“; (4) „Molecular biology of the neurons genome (the role of the neurons genome in the biosynthesis and secretion of the signal neurospecific molecules)“ and (5) „Physico-chemical pathology of interneuronal communication (physico-chemical basis of human neuronal and mental diseases)“. The formats of bibliographical data description in DB „Slice—90“ and „Local superfusion of the brain“ are listed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Леонтьева Т. М., Бурыкин О. Е., Розенман М. И. и др. *Вопр. информ. теории и практики*, № 55, с. 118—130, 1986.
2. Леонтьева Т. М., Дуганова И. С. *Научно-тех. инф.*, сер. 2, № 9, с. 5—11, 1989.
3. Selkov E. E., Goryanin I. I., Kaimatchnikov N. P., Shevelev E. L., Yunus I. A. *Studia Biophysica*, v. 129, p. 155—164, 1989.
4. Goryanin I. I., Shevelev E. L., Yunus I. A. *Studia biophysica*, v. 129, p. 165—170, 1989.
5. Замятин А. А.—В сб.: Физиологически активные пептиды, Пушкино, с. 3—14, 1988.
6. Замятин А. А. *Нейрохимия*, т. 9, № 1, с. 75—83, 1990.
7. Белик Я. В. *Нейрохимия. Библиографический указатель*, 1953—1962. Киев, Наукова думка, 1979.
8. Белик Я. В. *Нейрохимия. Библиографический указатель*, 1963—1967. Киев, Наукова думка, 1981.
9. Zagon I. S., McLaughlin P. J., Weaver D. J., Zagon E. *Neurosci. and Biobehav. Revs.* v. 6, p. 439—479, 1982.
10. In: *Neuropeptides*, (eds. M. F. Brownstein, F. Hughes). Churtil Livingstone v. 15—16, p. B40—B51, 1990.
11. Ерошкин А. М., Зыкова Н. А., Наумочкин А. Н., Куликов В. А. Тез. докладов «Физиол. и клин. значение регуляторных пептидов», Горький, 27—29 ноября 1990 г., Пушкино, с. 56, 1990.
12. Mc Ilwain H. *Biochem. J.*, v. 53, p. 413—412, 1953

13. *Mc Ilwain H.* Biochem. J., v. 55, p. 618—624, 1953.
14. *Mc Ilwain H. J.* Physiol. (L), v. 124, p. 117—129, 1954.
15. *Narayanawami A., Mc Ilwain H.* Biochem. J., v. 57, p. 663—606, 1954.
16. *Greengard O., Mc Ilwain H.* Biochem. J., v. 61, p. 61—68, 1955.
17. *Mc Ilwain H.* Biochemistry and the central nervous system, London, Churchill, 1955.
18. *Brain Slices* (ed. Dingleline R.), Plenum Press, N. Y., London, 1984.
19. *Brain Slices: Fundamentals, applications and implications.* (eds. Schurr A., Teyler A.) Conf. Louisville, 1986, Karger, Basel, 1987.
20. *Huttunen M. O.* Protein and ribonucleic acid metabolism in rat brain cortex slices. Acad. Diss. University, Helsinki, 1969.
21. *Dunlop D. S., van Elden D., Lajtha A.* Brain Res., v. 99, p. 303—318, 1975.
22. *Holtzman D., Olson J., Nguyen H.* Brain Res., v. 249, p. 387—389, 1982.
23. *Буданцев А. Ю.* Успехи соврем. биол., т. 109, вып. I, с. 146—158, 1990.
24. *Gaddum J. H. J.* Physiol. (L), v. 155, 1P, 1961.
25. *Butcher S. P., Hamberger A. J.* Neurochem., v. 48, p. 713—721, 1987.
26. *L'Heureux R., Dennis T., Curet O., Scatton B. J.* Neurochem., v. 46, p. 1794—1891, 1956.
27. *Imperato A., DiChiara G. J.* Neurosci., v. 4, p. 966—977, 1984.
28. *Chen J. C., Rhee K. K., Beaudry D. M., Ramirez V. D.* Neuroendocrinology, v. 38, p. 362—370, 1984.
29. *Kuhr W. G., Ewing A. G., Candill W. L., Wightman R. M. J.* Neurochem., v. 43, p. 560—569, 1984.
30. *Broderick P. A.* Life Sci., v. 36, p. 2269—2275, 1985.
31. *Mermet C., Suand-Chaguy M. F., Gonon F.* Neuroscience, v. 34, p. 423—432, 1990.
32. *Берещанский Д. Г.* Практическое программирование на dBASE, М., Финансы и статистика, 1989.
33. *Крайн Р.* Системы управления базами данных dBASE II и dBASE III для персональных компьютеров. М., Финансы и статистика, 1988.

Поступила 16. IV. 1991

ПРОБЛЕМНО-ОРИЕНТИРОВАННЫЙ БАНК ДАННЫХ «ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ МЕЖНЕЙРОНАЛЬНОЙ КОММУНИКАЦИИ В МОЗГУ» (PCIBIC-91)

В настоящее время готовится коммерческий вариант баз данных (БД) «Слайс-90» и «Локальная суперфузия мозга» в составе банка данных «Физико-химические основы межнейрональной коммуникации в мозгу». Сейчас проводится сбор предварительных заказов на эти БД.

Просьба такие заказы и все вопросы посылать по адресу: 142292 г. Пушкино, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, комн. 440. Цена указанных БД будет определена в зависимости от количества предварительных заказов и сообщена при оформлении договорных документов на поставку заказчикам БД. Время первой поставки—декабрь 1992 г.

УДК 577.112.6.085.23:577.112.6.088.6

СВЯЗЫВАНИЕ ТАФТСТИНА С ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ
МЕМБРАНАМИ МОЗГА КРЫСЫ, КЛЕТКАМИ ГЛИОМЫ
КРЫСЫ И НЕЙРОБЛАСТОМЫ МЫШИ

АРЕФЬЕВА И. А., АЛФЕЕВА Л. Ю., ГРИВЕННИКОВ И. А.

Институт молекулярной генетики АН СССР, Москва

Обнаружено специфическое взаимодействие тафтсина с плазматическими мембранами мозга крысы и клетками нейробластомы мыши (NB41A3, Neuro 2A) и глиомы крысы (C-6, НГУК-1). Показано, что связывание зависит от времени, обратимо, термолабильно и ингибируется при обработке клеток раствором трипсина. Оптимальные условия для проведения экспериментов на мембранах включают наличие в инкубационной среде 2 мМ CaCl_2 . Величины K_d для $[^3\text{H}]$ тафтсина на мембранах мозга и клетках нейробластомы (Neuro 2A) составляют около 10 мкМ и 2 мкМ соответственно. Классические нейротрансмиттеры и опийный антагонист налоксон в концентрации до 50 мкМ не оказывают влияния на взаимодействие тафтсина с клетками нервной системы.

Тафтсин (Thr-Lys-Pro-Arg), представляющий собой фрагмент тяжелой цепи иммуноглобулина G (аминокислотные остатки 289—292), широко известен как эндогенный иммуностимулятор [1]. Рецепторы для этого пептида были выявлены и охарактеризованы на макрофагах мыши [2], а также на моноцитах и полиморфноядерных лейкоцитах периферической крови человека [3]. Сравнительно недавно было обнаружено стимулирующее действие тафтсина и некоторых его аналогов на ЦНС млекопитающих [4, 5], а также на активность ключевого фермента обмена катехоламинов—тирозингидроксилазы [6].

Целью настоящей работы явился поиск центров связывания тафтсина на плазматических мембранах мозга крысы и трансформированных линиях клеток нейронального и глиального происхождения.

Материалы и методы

В работе использованы трис („Merck“, ФРГ), сахароза, DDC-Na и ЭДТА („Serva“, ФРГ), полиэтиленгликоль („Fluka“, Швейцария), бензамидин, фенилметилсульфонилфторид и БСА („Sigma“, США), все реактивы для работы с клетками, а также культуральная пластиковая посуда фирмы «Flow» (Англия).

Клетки линий C-6, NB-41A3 и Neuro-2a получены от фирмы «Flow», линия НГУК-1 была любезно предоставлена А. С. Холашским (Институт морфологии животных АМН СССР).

Тафтсин синтезирован нами ступенчатым наращиванием полипептидной цепи методом активированных эфиров. Введение тритиевой метки осуществлено в лаборатории изотопного обмена Д. А. Зайцевым. Величина У. А. полученных препаратов составляла 50—60 Ки/ммоль, их гомогенность и идентичность немеченому пептиду подтверждена ВЭЖХ.

Мембраны мозга, сердца, печени и почек крысы, а также клеток линий *C-6*, *НГУК-1* и *Neuro-2A* получали по методу Grau, Whitaker [7] с небольшими модификациями. В частности, для получения мембран мозга использовали следующую схему: беспородных белых крыс (180—200 г) декапировали, извлеченный мозг промывали холодным физиологическим раствором и гомогенизировали в 10 объемах холодной 0,32 М сахарозы, содержащей 1 мМ ЭДТА, 1 мМ бензамидина и 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторида (буфер А). Все последующие операции проводили при 4°. Гомогенат центрифугировали при 1000 г в течение 20 мин, осадок отбрасывали, а супернатант, профильтрованный через 4 слоя марли, подвергали повторному центрифугированию при 40000 г в течение 30 мин. Полученный осадок дважды промывали буфером А, суспендировали в 10 мМ трис-НСl, pH 7,4, содержащем 0,22 М сахарозы и 1 мг/мл БСА и хранили в жидком азоте. Концентрация белка для хранения составляла 15—30 мг/мл (определена по модифицированному методу Лоури [8]). Мембраны сердца, печени и почек крысы, а также клеток линий *C-6*, *NB-41A3* и *Neuro-2A* получали аналогично.

Связывание проводили в 3,5-мл литровых полистирольных пробирках для РИА. Реакционная смесь общим объемом 1 мл содержала 1 мКи [³H]тафтсина, соответствующее количество немеченого пептида и 2 мМ CaCl₂ в 50 мМ трис-НСl, pH 7,4. Реакцию начинали добавлением 500 мкг мембран в 200 мкл буфера. Пробирки переносили в шейкер-инкубатор и выдерживали 40—60 мин при температуре 30° и постоянном интенсивном перемешивании. По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолоконные фильтры («Whatman», GF/B), вымоченные в 0,3%-ном растворе полиэтиленмина в течение 2 ч и промытые 3 мл ледяного 50 мМ трис-НСl, pH 7,4. Этим же буфером трижды промывали каждую пробирку и 1 раз фильтр. Фильтры сушили на воздухе и считали в 5 мл толуольного сцинтиллятора (4 г PPO, 0,2 г POROP) с эффективностью 30% на счетчике «Mark-2» («Nuclear Chicago», США). Неспецифическое связывание определяли в присутствии 10⁻⁴ М немеченого тафтсина. Контрольные пробирки содержали те же компоненты, что и в опыте, но не подвергались инкубации, а фильтровались сразу же после добавления белка.

Клетки линий *C-6*, *NB-41A3*, *Neuro-2A* и *Vero*, культивируемые в пластиковых культуральных флаконах на среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки, 2 мМ глутамин и 0,16 мг/мл гентамицина, при 37° и концентрации CO₂ 5%, снимали раствором Версена и сеяли в 96-луночные культуральные микропласты по 50—100 тыс. в 100 мкл

ростовой среды. На следующий день клетки дважды промывали 100 мкл раствора Хенкса и добавляли 100 мкл инкубационной смеси, содержащей 0,3 мкКи $[^3\text{H}]$ тафтсина и соответствующее количество немеченого пептида. По окончании инкубации (37° , 30 мин), смесь отбирали, а слой клеток трижды промывали 200 мкл раствора Хенкса, растворяли в 120 мкл 0,1%-ного ДДС- Na и 100 мкл полученного раствора считали в 5 мл диоксанового сцинтиллятора ЖС-8 с эффективностью 30% на счетчике «Rackbeta» (LKB, Швеция).

Клетки линий C-6, NB-41A3 и Neuro-2A, культивируемые как указано выше, снимали раствором Версена, центрифугировали и рассевали в круглодонные 96-луночные платы по 100 тыс. клеток в 50 мкл раствора Хенкса, добавляли 50 мкл раствора, содержащего смесь 0,3 мкКи меченого и соответствующее количество немеченого тафтсина и инкубировали 30 мин при 37° . По окончании инкубации клетки собирали полуавтоматическим харвестером («Scatron», Англия) на стекловолоконные фильтры («Whatman», GF/C Англия) с промывкой фосфатно-солевым буфером (10 mM фосфата натрия, 150 mM NaCl , pH 7,4). Фильтры считали в 5 мл диоксанового сцинтиллятора с эффективностью 30%.

Результаты исследования

1. Связывание тафтсина с мембранами различных органов крысы.

Для доказательства специфичности взаимодействия тафтсина с клетками НС, было изучено связывание меченого препарата с мембранами мозга, сердца, почек и печени крысы (рис. 1). Оказалось, что количество пептида, специфически связавшегося с мембранами сердца, почек и печени за 60 мин инкубации при 30° , составляет соответственно 14, 6 и 16% от количества пептида, связавшегося с нервной тканью.

Мембраны мозга были подвергнуты дальнейшей очистке в ступенчатом градиенте сахарозы (0,32, 0,8, 1,2 М, 21000 об/мин 2 ч на роторе SW-25, L5-50, «Beckman», Австрия) [7]. При этом получены три фракции, первая из которых, находящаяся на границе 0,32 и 0,8 М сахарозы, обогащена миелином, вторая (0,8—1,2 М)—синаптосомными мембранами, третья (осадок на дне пробирки)—митохондриями. Связывание $[^3\text{H}]$ тафтсина с этими фракциями за 60 мин представлено на рис. 2, из которого видно, что фракция, обогащенная синаптосомными мембранами, связывает тафтсин в 2,5 раза более эффективно, чем миелиновая и в 30 раз более эффективно, чем митохондриальная.

На рис. 3 и 4 показана обратимость связывания $[^3\text{H}]$ тафтсина с мембранами целого мозга при 50-кратном разведении и добавлении избытка немеченого пептида соответственно. Связывание зависит от времени и достигает равновесия через 40 мин при 30° . При добавлении 50-кратного избытка буфера или 1000-кратного избытка неме-

ченого пептида наблюдается быстрая (1—2 мин) диссоциация половины связанной метки с последующим снижением до базового уровня в течение 60 мин. Термическая обработка мембран при 100°

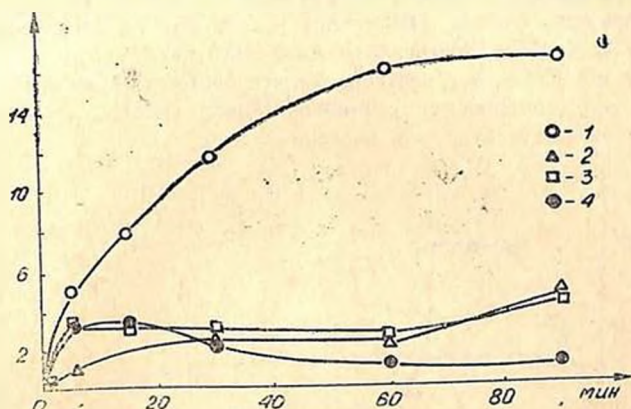


Рис. 1. Связывание тафтсина с мембранами мозга (1), сердца (2), печени (3), и почек (4) крысы при 30°. 1 мл реакционной смеси содержит 1 мкКи (460 пмоль) [³H]тафтсина, 500 мкг белка и 2 мМ СаСl₂ в 50 мМ трис-НСl, рН 7,4. Неспецифическое связывание определено в присутствии 100 мкМ немеченого пептида. Данные представляют результат двух экспериментов. Здесь и на рис. 2, 5, 7 по оси ординат — специфическое связывание (имп/мин · 10⁻³ М).

в течение 15 мин приводит к полной инактивации участков связывания.

Изучение влияния ионов двухвалентных металлов на связывание тафтсина с мембранами мозга показало, что Mg²⁺ (5 мМ) оказывает

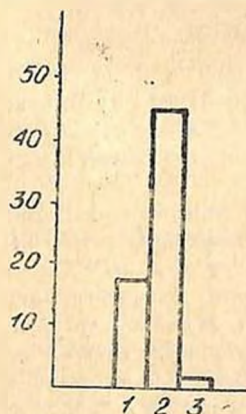


Рис. 2. Связывание тафтсина с препаратами, обогащенными миелином (1), синапсомембранами (2) и митохондриями (3). 1 мл реакционной смеси содержит 4,5 мкКи (500 пмоль) [³H]тафтсина, 700 мкг мембран и 2 мМ СаСl₂ в 50 мМ трис-НСl, рН 7,4. Инкубация 1 ч при 30°. Специфическое связывание определено в присутствии 100 мкМ немеченого пептида. Данные представляют средний результат двух измерений.

слабое активирующее воздействие. Наличие в среде инкубации ионов Zn, Со и Мп (1 мМ) приводит к денатурации мембран. Ионы Са увеличивают специфическое связывание тафтсина максимум в 2 раза.

причем его зависимость от концентрации ионов носит колоколообразный характер (рис. 5). Оптимальным является 2 мМ раствор CaCl_2 . Специфическое связывание $[^3\text{H}]$ тафтсина с мембранами мозга зависит от природы буфера. Наилучшие результаты (специфическое связывание 35 и 40%) достигаются в 50 мМ трис- HCl , pH 7,4, содержащем 2 мМ CaCl_2 , и в растворе Хенкса соответственно. Применение последнего ограничивается его сравнительно высокой стоимостью и большим расходом буфера в эксперименте.

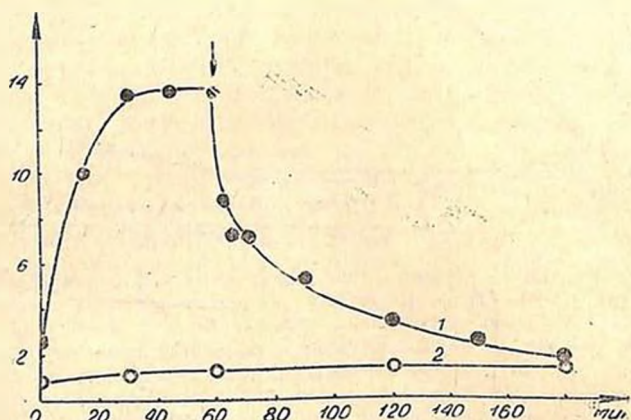


Рис. 3. Диссоциация тафтсина с мембран мозга при разведении (1). Связывание проводили в 0,5 мл раствора Хенкса при 30° в течение 1 ч, затем смесь разбавляли буфером в 50 раз (отмечено стрелкой). Концентрация $[^3\text{H}]$ тафтсина в исходной смеси 6 мкКи/мл, белка—0,5 мг/мл. Контрольные пробирки содержали 3 мкКи метки и 250 мкг белка в 25 мл раствора Хенкса (2). Данные представляют результат трех экспериментов. Здесь и на рис. 4 по оси ординат—общее связывание (имп/мин · 10⁻³ М)

На рис. 6 показана кривая вытеснения $[^3\text{H}]$ тафтсина с мембран мозга крысы немеченым пептидом. Величины K_d и максимального связывания, определенные из данной зависимости, составляют около 10 мкМ и 40 пмоль/мг белка соответственно.

2. Связывание тафтсина с трансформированными нервными клетками.

$[^3\text{H}]$ тафтсин специфически связывается с прикрепленными и не-прикрепленными клетками глиомы крысы (линии C-6, ИГУК-1) и нейробластомы мыши (линия Neuro-2A). Процент специфического связывания от общего изменяется для различных линий прикрепленных клеток от 30 (C-6) до 70% (Neuro-2A), а для неприкрепленных от 53 (C-6) до 78% (Neuro-2A), причем специфическое связывание полностью исчезает при использовании для снятия клеток с подложки раствора трипсина (0,05% в 0,2% ЭДТА) вместо раствора Версена (инкубация для открепления клеток в обоих случаях длится 10 мин при 37°). В качестве контроля были использованы прикрепленные

трансформированные клетки почечного эпителия зеленой мартышки (линия Vero). Связывание в этом случае отсутствовало.

Мембраны клеток нейрональных и глиальных линий, полученные так же как и мембраны мозга, сохраняют способность связывать [^3H]тафсина с той же эффективностью, что и живые клетки (данные не приведены).

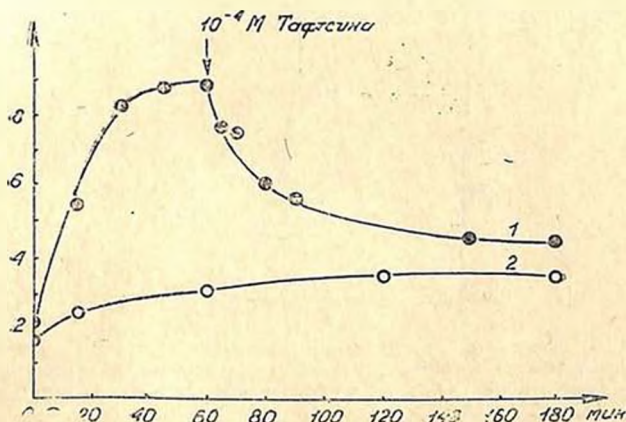


Рис. 4. Диссоциация [^3H]тафсина с мембраны мозга под действием немеченого пептида (1). Связывание проводили в 50 мМ трис- HCl , pH 7,4 в присутствии 2 мМ CaCl_2 при 30°. Концентрация тафсина в исходной смеси составляла 1 мкКи/мл (17 нМ), белка—500 мкг/мл. Через 60 мин (указано стрелкой) добавляли 50 мкл раствора немеченого пептида до конечной концентрации 100 мкМ. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 100 мкМ немеченого тафсина (2). Данные представляют результат двух экспериментов

Параметры связывания пептида оценены в эксперименте на прикрепленных клетках линии *Neuro-2A* (рис. 7). Из кривой вытеснения найдено, что K_d составляет около 2 мкМ, а максимальное связывание—2,3 пмоль на 100 тыс. клеток.

Классические нейротрансмиттеры (норадреналин, дофамин, серотонин и гистамин), а также универсальный опиатный антагонист налоксон в концентрациях 50 мкМ не оказывают влияния на взаимодействие тафсина с клетками НС.

Обсуждение результатов

Предпринятый нами поиск центров связывания тафсина на препаратах нервной ткани млекопитающих обусловлен наличием целого ряда работ, выполненных на физиологическом и поведенческом уровнях, и касающихся действия этого пептида на некоторые функции ЦНС [4—6, 9]. Сравнение эффективности связывания меченого пеп-

тида с мембранами мозга, сердца, печени и почек крысы убедительно демонстрирует предпочтительное взаимодействие тафтенина с препаратом нервной ткани (рис. 1). Аналогичный результат был получен при работе с трансформированными культурами нервных и глиаль-

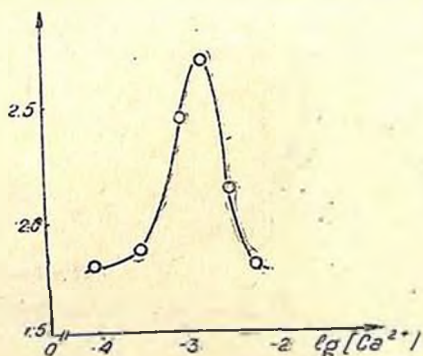


Рис. 5. Зависимость специфического связывания тафтенина с мембранами мозга крысы от концентрации ионов кальция. 1 мл реакционной смеси содержит 1 мкКи (17 пмоль) $[^3H]$ тафтенина в 50 мМ трис-НСl, pH 7.4. Специфическое связывание определяли в присутствии 100 мкМ немеченого пептида. Данные представляют результат двух экспериментов

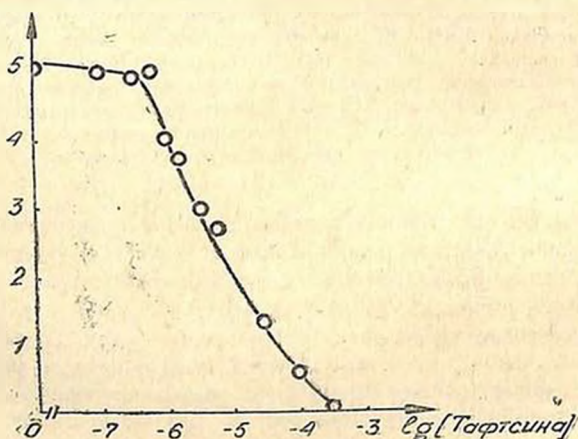


Рис. 6. Вытеснение $[^3H]$ тафтенина с мембран мозга крысы немеченым пептидом. Реакционная смесь содержит 1 мкКи (17 пмоль) $[^3H]$ тафтенина, 500 мкг белка и 2 мМ $CaCl_2$ в 1 мл 50 мМ трис-НСl, pH 7.4. Инкубация 40 мин при 35°. Данные представляют средний результат двух измерений

ных клеток грызунов. Специфическое связывание с этими клетками достигало 80% и полностью отсутствовало в экспериментах на трансформированных клетках почечного эпителия зеленой мартышки (линия Vero).

Для изучения субклеточной локализации центров связывания тафтсина нами были получены фракции сахарозного градиента, обогащенные, согласно данным литературы [7], миелином, синапсомембранами и митохондриями. При этом было обнаружено преимущественное связывание меченого пептида с синапсомембранами (рис. 2). Довольно значительное включение метки в случае миелиновой фракции, вероятно, можно объяснить наличием в ней более легких фрагментов синапсомембран.

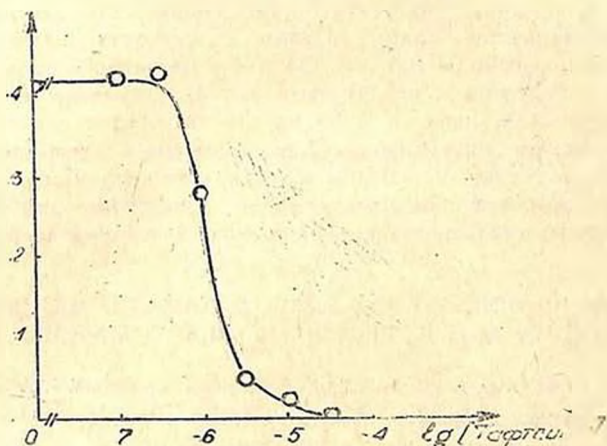


Рис. 7. Вытеснение $[^3\text{H}]$ тафтсина немеченым пептидом с неприсоединенных клеток линии *Neuro-2A*. Реакционная смесь содержит 0,3 мкМ (5 пмоль) $[^3\text{H}]$ тафтсина, 100 тыс. клеток и соответствующее количество немеченого пептида в 100 мкл раствора Хенкса. Инкубация 30 мин при 37° . Данные представляют средний результат четырех измерений

Преимущественное взаимодействие тафтсина с нервной тканью, в частности с синапсомембранами, зависимость этого процесса от времени, его обратимость и термолабильность, а также колоколообразная зависимость от концентрации ионов кальция позволяют сделать вывод о существовании на клетках НС центров связывания тафтсина. Вопрос о природе этих центров остается открытым, хотя результаты экспериментов по обработке клеток нейробластомы (*NB41A3*) трипсином указывают на ее белковый характер.

Обращает на себя внимание довольно высокое значение K_d , полученное в наших экспериментах (около 10 мкМ для мембран мозга и около 2 мкМ для клеток нейробластомы). Известно, что аналогичная величина для макрофагов и лейкоцитов составляет 50—100 нМ [2, 3]. Однако для других пептидов, в частности для опиоидных, известны участки связывания с низким сродством (K_d для Leu-энкефалина 0,7 и 55 мкМ), локализованные не в НС, а на энтероцитах [10]. Важно отметить, что несмотря на относительно низкое сродство тафтсина к обнаруженным нами центрам, именно через них могут осуще-

ствляться описанные в литературе [4, 5, 9] физиологические эффекты этого пептида на ЦНС. Так, при системном введении от 100 до 1000 мкг/кг тафтсина крысе весом 200 г концентрация пептида в крови может достигать 13—130 мкМ. Если предположить, что значительная часть пептида проникает в мозг, то его действие на ЦНС может осуществляться через обнаруженные нами центры связывания. Для объяснения полученных результатов можно предложить несколько гипотез. Во-первых, возможно, на мембранах нервных клеток существуют рецепторы, аналогичные находящимся на клетках крови, но модифицированные таким образом, что сродство к ним пептида уменьшено примерно в 100 раз. Вторая возможность заключается в связывании тафтсина с рецепторами других регуляторных пептидов, локализованных в мозгу. В этом случае становится понятным относительно высокое значение K_d . Не исключена также возможность связывания тафтсина со специфическими низкоаффинными центрами, отличными от рецепторов клеток крови. Для выяснения этого вопроса предполагается проведение ряда дополнительных экспериментов.

TUFTSIN BINDING TO RAT BRAIN PLASMATIC MEMBRANES, RAT GLIOMA AND MURINE NEUROBLASTOMA CELL LINES

AREFYEVA I. A., ALFEEVA L. Yu., GRIVENNIKOV I. A.

Institute of Molecular Genetics Academy of Science USSR

Tuftsln specifically binds to rat brain membranes, rat glioma (C—6, NGUK—1) and murine neuroblastoma (NB41A3, Neuro-2A) cells. The binding is time-dependent, reversible and thermolabile. Optimal experimental conditions include the presence of CaCl_2 (2 mM) in the incubation medium. Cells pretreatment with trypsin solution causes complete inhibition of the binding. K_d values for $[^3\text{H}]$ tuftsln binding to rat brain membranes and neuroblastoma cells Neuro-2A are about 10 μM and 2 μM respectively. Common neurotransmitters and opiate antagonist naloxone at the concentration up to 50 μM fail to alter the binding.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fridkin M., Najjar V. A. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol., v. 24, p. 1—40, 1989.
2. Dagan S., Gottlieb P., Tzehoval E., Feldman M., Fridkin M., Yasumura K., Okamoto K., Yajima A. J. Med. Chem., v. 29, p. 1961—1965, 1986.
3. Stabinsky Y., Gottlieb P., Zakuth V., Spirer Z., Fridkin M. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 83, p. 599—606, 1978.
4. Вальдман А. В., Козловская М. М., Ашмарин И. П., Минеева М. Ф., Анохин К. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 92, с. 31—33, 1981.

Авторы выражают глубокую благодарность Д. А. Зайцеву за предоставленные препараты $[^3\text{H}]$ тафтсина и С. В. Зайцеву за критическое обсуждение полученных результатов.

5. Вальдман А. В., Бондаренко В. А., Козловская М. М., Русаков Д., Калихевич В. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 93, с. 49—52, 1982.
6. Минеева М. Ф. — В кн.: Нейрохимические основы психотропного эффекта, с. 53—67, М., НИИ фармакологии АМН СССР, 1982.
7. Gray E. G., Whittaker V. P. J. Anat., v. 96, p. 79—87, 1962.
8. Cadman E., Bostwick J. R., Eichberg J. J. Anal. Biochem., v. 96, p. 21—23, 1979.
9. Herman Z. S., Stachura Z., Krezeminski T., Plech A., Siemion I. Z., Nawrocka E. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 419, p. 156, 1983.
10. Lopez-Ruiz M. P., Arilla E., Gomez-Pan A., Prieto J. C. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 126, p. 404—411, 1985.

Поступила 3. XII. 1990

Transmembrane Signalling, Intracellular Messengers and Implications for Drug Development (ed. S. R. Nahorski), J. Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester, 263 p., 1990.

Трансмембранный перенос сигналов, внутриклеточные передатчики и рекомендации для разработки лекарств.

Известные эксперты международного класса из ведущих лабораторий Европы и США обсуждают последние достижения в области расшифровки структуры рецепторов, трансмембранной передачи информации, образования вторичных мессенджеров и их действия.

Впервые в пределах одной книги обеспечивается квалифицированный подход к каждой из областей и даются рекомендации по использованию препаратов, управляющих трансмембранной передачей сигналов.

В книге имеются следующие разделы:

Структурные детерминанты связывания лигандов с α - и β -адренорецепторами;

Молекулярная фармакология клонированных мускариновых рецепторов;

Подтипы G-белков: структурная идентификация и изучение функций;

Роль G-белков в сопряжении рецепторов с ионными каналами;

Трансмембранная передача сигналов G-белками;

Зависимая от G-белков регуляция фосфолипазы C в мембранах эритроцитов индейки;

Модуляция тока Ca в нейронах активированием G-белков;

G-белки и передача сигналов, регулирующих рост клеток;

Регуляция аденилатциклазы;

Рецепторы, регулирующие внутриклеточный уровень Ca^{2+} ;

Инозитолфосфатазы как внутриклеточные вторичные мессенджеры;

Управление переноса Ca^{2+} рецепторами;

Синтез и биология аналогов вторичных мессенджеров.

5. Вальдман А. В., Бондаренко В. А., Козловская М. М., Русаков Д., Калихевич В. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 93, с. 49—52, 1982.
6. Минеева М. Ф. — В кн.: Нейрохимические основы психотропного эффекта, с. 53—67, М., НИИ фармакологии АМН СССР, 1982.
7. Gray E. G., Whittaker V. P. J. Anat., v. 96, p. 79—87, 1962.
8. Cadman E., Bostwick J. R., Eichberg J. J. Anal. Biochem., v. 96, p. 21—23, 1979.
9. Herman Z. S., Stachura Z., Krezeminski T., Plech A., Siemion I. Z., Nawrocka E. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 419, p. 156, 1983.
10. Lopez-Ruiz M. P., Arilla E., Gomez-Pan A., Prieto J. C. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 126, p. 404—411, 1985.

Поступила 3. XII. 1990

Transmembrane Signalling, Intracellular Messengers and Implications for Drug Development (ed. S. R. Nahorski), J. Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester, 263 p., 1990.

Трансмембранный перенос сигналов, внутриклеточные передатчики и рекомендации для разработки лекарств.

Известные эксперты международного класса из ведущих лабораторий Европы и США обсуждают последние достижения в области расшифровки структуры рецепторов, трансмембранной передачи информации, образования вторичных мессенджеров и их действия.

Впервые в пределах одной книги обеспечивается квалифицированный подход к каждой из областей и даются рекомендации по использованию препаратов, управляющих трансмембранной передачей сигналов.

В книге имеются следующие разделы:

Структурные детерминанты связывания лигандов с α - и β -адренорецепторами;

Молекулярная фармакология клонированных мускариновых рецепторов;

Подтипы G-белков: структурная идентификация и изучение функций;

Роль G-белков в сопряжении рецепторов с ионными каналами;

Трансмембранная передача сигналов G-белками;

Зависимая от G-белков регуляция фосфолипазы C в мембранах эритроцитов индейки;

Модуляция тока Ca в нейронах активированием G-белков;

G-белки и передача сигналов, регулирующих рост клеток;

Регуляция аденилатциклазы;

Рецепторы, регулирующие внутриклеточный уровень Ca^{2+} ;

Инозитолфосфатазы как внутриклеточные вторичные мессенджеры;

Управление переноса Ca^{2+} рецепторами;

Синтез и биология аналогов вторичных мессенджеров.

УДК 577.153.4—615.355

ОБРАТИМЫЕ ИНГИБИТОРЫ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЗРИТЕЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ КОМАНДОРСКОГО КАЛЬМАРА: СИЛАТРАНОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ ЭЛЕМЕНТООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

РОЗЕНГАРТ Е. В., КОВАЛЕВ Н. Н., ФЕДОРЦ Ю. А., ШЕСТАКОВА Н. Н.,
ЭПШТЕЙН Л. М., ХОВАНСКИХ А. Е.

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

Показано обратимое ингибирующее действие группы силатрановых производных на активность холинэстеразы зрительных ганглиев особей командорского кальмара *Berrytheutis magister*, обитающих в различных зонах Берингова моря. В качестве ингибиторов исследованы органические соединения с разной природой гетероатома (азот, сера, селен, телур), а также тионовый силатрансодержащий фосфорорганический ингибитор. Выявлена зависимость антихолинэстеразного действия от определенных нами геометрических параметров молекулы ингибиторов. Подтверждена гетерогенность свойств холинэстеразы особей кальмара из разных зон обитания, что, видимо, связано с наличием внутривидовых группировок у командорского кальмара.

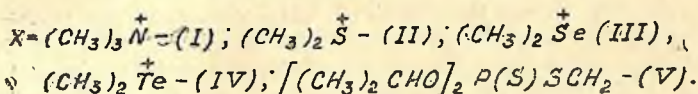
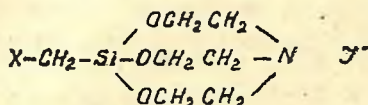
Холинэстераза (ХЭ) обладает тканевой и видовой специфичностью [1]. Как правило, это отражается на субстратно-ингибиторных характеристиках ХЭ из разных объектов. Нами были изучены свойства ХЭ особей командорского кальмара, обитающих в разных зонах Берингова моря [2—8]. Различия между ХЭ особей проявлялись в разной чувствительности к ряду обратимых ингибиторов.

Обратимые ингибиторы ХЭ (исключая «безадресные» антихолинэстеразные вещества) можно подразделить на два типа: для одних (и их большинство) мишенью действия является область анионного центра ХЭ [9], а другие тормозят активность ХЭ за счет сорбции в районе эстеразного центра [7]. Такое деление является в известной степени условным, однако оно позволяет подойти к «конструированию» обратимого ингибитора. Его молекула должна состоять из функциональной группировки; для первого типа ингибиторов может служить пералкилированный оциевый атом элементов V или VI групп Периодической системы, либо группа, способная к ионизации при близких к нейтральным значениям pH (например, замещенные аминогруппы), а также группа, пространственно имитирующая три-метиламмониевую группировку АХ, природного субстрата ХЭ (например, третично-бутильная группа). Для второго типа ингибиторов в

качестве функциональной группы может выступать фосфорильная группа молекулы фосфорорганического ингибитора (ФОИ), не способного к фосфорилированию ХЭ. Этому условию отвечают либо тиофосфаты ($P=S$), которые из-за отсутствия выраженного акцептора водородной связи не могут так «организовать» активный центр ХЭ, чтобы образовался активированный гидроксил серина [1], либо фосфаты, которые более склонны к реакции алкилирования [1], либо циклофосфаты, атом фосфора которых экранирован, вследствие чего недоступен для атаки активированным гидроксилом серина.

Что касается гидрофобной части, то здесь для химической «фантазии» нет ограничений. Однако именно гидрофобная часть молекулы обратимого ингибитора, как правило, определяет его специфичность.

Исходя из этих теоретических представлений, мы изучили в качестве обратимых ингибиторов ХЭ командорского кальмара группу силатрановых производных элементоорганических соединений:



На основании полученных результатов мы пришли к следующим выводам.

Наличие оневой группы, способной взаимодействовать с анионным центром ХЭ, позволяет отнести соединения I—IV к первому типу обратимых ингибиторов. Соединения I—IV представляют собой уникальную группу с различной природой онеевого атома.

Соединение V, будучи тионовым ФОИ, неспособно необратимо ингибировать ХЭ [1], однако обратимое торможение оно осуществляет главным образом за счет взаимодействия с эстеразным центром [7], то есть может быть отнесено ко второму типу обратимых ингибиторов.

Все эти соединения (I—V) содержат силатрановую группу, обладающую, с одной стороны, суперэлектроннодонорными свойствами [10], что должно понизить эффективный заряд онеевой группы (соед. I—IV) и препятствовать разрыву сложноэфирной связи в соединении V, а, с другой стороны, из-за «втягивания» неподеленной пары электронов азота, что исключает его протонирование, силатран можно рассматривать как гидрофобную группировку.

Благодаря не содержащему силатрана соединению VI— $(CH_3)_2SeCH_2-Si(OCH_2CH_3)_3$ I—(VI) появилась возможность оценить силатрановый вклад в ингибиторные свойства соединения III.

Представлял практический интерес поиск в этой группе соединений специфических ингибиторов ХЭ особой камбодорского кальмара из разных зон обитания.

Материалы и методы

Изученные соединения синтезированы в Иркутском институте органической химии Сибирского отделения АН СССР [10].

В качестве ферментов использовали коммерческие препараты ацетил-ХЭ (АХЭ) эритроцитов крови человека (НФ 3.1.1.7) и бутирил-ХЭ (БХЭ) сыворотки крови лошади (НФ 3.1.1.8) с величиной У. А. 1,2 и 9,6 (Пермский НИИ вакцин и сывороток).

Особь камбодорского кальмара, *Be rythentis magister* были выловлены в районе Курильских островов («южные»), а также в Олюторо-Наваринском («западные») и Прибылово-Аляскинском («северные») районах Берингова моря. Активность ХЭ в гомогенате (3 мг/мл) ткани зрительных ганглиев определяли модифицированным колориметрическим методом Элмана [11]. Эффективность ингибиторов характеризовали вычислением обобщенной ингибиторной константы $\bar{K}_i$, которая при смешанном типе торможения взаимосвязана с конкурентной (K_i) и бесконкурентной (K'_i) составляющими согласно формуле $1/\bar{K}_i = 1/K_i + 1/K'_i$. Для определения величин K_i и K'_i измеряли начальные скорости ферментативного гидролиза субстрата при разных его концентрациях, включая равную константе Михаэлиса как в присутствии разных концентраций ингибитора, так и без него. Величины констант ингибирования определяли графически [11] и выражали в виде $p\bar{K}_i = -\lg \bar{K}_i$ и т. д. По соотношению величин pK_i и pK'_i определяли тип торможения: конкурентный ($pK'_i \rightarrow 0$), смешанный ($pK_i > pK'_i$), неконкурентный ($pK'_i = pK_i$).

Результаты и обсуждение

Геометрия ониевой группировки. Катионные группировки силатрахов производных (табл. 1) существенным образом отличаются как по уровню симметрии, так и по общему объему группировки. В 3-, 4- и 5-й графах табл. 1 приведены линейные размеры катионных группировок (R_1 , R_2 , R_3), которые определяли как расстояние от центра ониевого атома вдоль радиусов, проведенных по направлению его валентных связей. Так, для соединения I триметиламмониевая катионная группировка имеет сферическую симметрию, о чем свидетельствует равенство значений $R_1 = R_2 = R_3$. У соединений II—IV катионная группировка имеет неправильную форму: значения R_1 значительно меньше R_2 и R_3 . Увеличение радиуса ониевого атома в представленном ряду, не отражаясь на общей конфигурации катионной группировки, существенным образом увеличивает ее объем (V). Как видно из 6-й графы таблицы, даже при переходе от триметиламмониевой группировки к диметилсульфониновой, несмотря на потерю метильной группы, объем возрастает на 15%.

Обратимость ингибирующего действия. Соединения I—VI оказались обратимыми ингибиторами изученных ХЭ: 1) их эффективность не зависела от времени инкубации с ферментом; 2) степень ингибирующего действия снижалась при разбавлении реакционной смеси. Обе эти характеристики являются необходимыми и достаточными для идентификации обратимого типа торможения.

Таблица 1

Геометрические характеристики ониевых группировок силатрановых производных (расчеты проведены по данным Бокш [12])

Соединения	Ониевая группировка	R_1 , нм	R_2 , нм	R_3 , нм	V , нм ³
I	$N(CH_3)_3$	0.203	0.203	0.203	0.00770
II	$S(CH_3)_2$	0.104	0.237	0.237	0.03889
III	$Se(CH_3)_2$	0.117	0.250	0.250	0.00991
IV	$Te(CH_3)_2$	0.137	0.270	0.270	0.01201

Взаимодействие с АХЭ и БХЭ. Как показано выше, соединения I—IV принадлежат к такому типу обратимых ингибиторов, которые взаимодействуют главным образом с анионным центром (табл. 2). Принято считать, что обратимые ингибиторы выраженной ониевой природы являются более сильными эффекторами АХЭ [1, 9]. В полном соответствии с этим соединения I, III, IV оказались в 10—30 раз, а соединение II—даже в 230 раз более сильными ингибиторами АХЭ, чем БХЭ. Превосходство сульфониевого производного (соединение II) перед аммониевым (соединение I) по отношению к АХЭ можно предположительно связать с переходом от симметричной триметиламмониевой группы к несимметричной диметилсульфониевой группе (табл. 1). Такая асимметрия делает вероятным подход к анионному центру АХЭ на меньшее расстояние, что может повлиять на электростатическую и стерическую характеристики сорбционного процесса. Снижение антиацетилхолинэстеразной эффективности у селениевого (соединение III) и телуриинового (соединение IV) производных, видимо, связано с увеличением объема ониевой группировки (табл. 1).

Сравнение соединений III и VI дает возможность оценить вклад в ингибиторную активность наличия силатрановой группировки. Следует учесть неоднозначность замены силатрановой группы (соединение III) на триэтилсилоксановую (соединение IV). С одной стороны, отсутствие суперэлектроннодонорной группировки должно повысить эффективный заряд ониевой группы, вследствие чего можно ожидать усиления ингибиторных свойств. Но с другой стороны, переход от компактной силатрановой структуры к конформационно гибкой объемной силоксановой группировке сопряжен с существенными стерическими затруднениями. Резкое снижение (более чем в 30 раз) ин-

Таблица 2

Кинетические параметры взаимодействия силатрановых производных с АХЭ
из эритроцитов человека и БХЭ сыворотки крови лошади

Соединения	Ф о р м у л а	АХЭ				БХЭ			
		pK_i	pK_i	pK_i'	тт	pK_i	pK_i	pK_i'	тт
I	$(CH_3)_3N^+-CH_2-Si(OCH_2CH_2)_3N^-I$	5,04	4,92	4,42	с	4,07	3,51	3,92	н
II	$(CH_3)_2S^+-CH_2-Si(OCH_2CH_2)_3N^-I$	5,66	5,61	4,24	с	3,29	3,22	2,47	с
III	$(CH_3)_2Se^+-CH_2-Si(OCH_2CH_2)_3N^-I$	4,90	4,48	3,54	с	3,54	3,54	—	н
IV	$(CH_3)_2Te^+-CH_2-Si(OCH_2CH_2)_3N^-I$	4,58	4,55	3,41	с	3,10	3,10	—	к
V	$(CH_3)_2CHO \begin{matrix} \backslash p \\ \backslash S \\ (CH_3)_2CHO \end{matrix} SC_2H_4-Si(OCH_2CH_2)_3N$	4,52	4,15	4,27	н	5,53	5,53	—	к
VI	$(CH_3)_2Se^+-CH_2-Si(OCH_2CH_2)_3N^-I$	3,47	3,30	2,98	с	3,53	3,53	—	к

Примечание. Типы торможения (тт): конкурентный (к), смешанный (с), неконкурентный (н).

либаторных свойств у соединения VI свидетельствует о приоритете стерического эффекта.

Ранее была описана пространственно ограниченная модель аннионного центра БХЭ [13]. С такой моделью в определенной мере согласуются наши данные по соединениям I—IV. Сорбция конформационно жесткой молекулы опиевого силатранового ингибитора в районе аннионного центра БХЭ пространственно затруднена. Видимо, с этим связана как сравнительно низкая эффективность, так и практическое отсутствие дифференциации от структуры ингибитора (по величинам pK_i). Подтверждением этому служит и тот факт, что раскрытие силатранового бицикла (соединение VI) не дало эффекта, в отличие от АХЭ. Другими словами, некомплементарность силатранового ингибитора по отношению к активной поверхности БХЭ столь существенна, что к этому ничего не добавляет ни превращение силатрана в объемную триэтилсилаксановую группу, ни увеличение объема опиевой группировки. Оказалось, что аммониевое производное (I) несколько активнее остальных: так, по величине K_i соединение I в 5 раз сильнее соединения II и в 10 раз эффективнее соединения IV. Предположительно это связано со способностью $(CH_3)_3N$ -группировки сорбироваться и вне активного центра с периферическими аннионными группировками. Так, в случае АХЭ для соединения I характерен наибольший вклад бесконкурентной составляющей K_i , а по отношению к БХЭ преимущество соединения I перед соединением II по величине K_i было 30-кратным.

Особого внимания заслуживает обратимый тионовый ФОИ (соединение V), который может взаимодействовать с эстеразным центром ХЭ. Видимо, за счет того, что эстеразный центр БХЭ более комплементарен диизопропилфосфатной группировке (известно, что высокоспецифическим ФОИ для БХЭ является диизопропилфторфосфат [1]), соединение V оказалось на порядок более сильным ингибитором БХЭ по сравнению с АХЭ. Если же учитывать только сорбцию в активном центре (по величинам конкурентной составляющей K_i), то различие в чувствительности между ХЭ было 25-кратным. Еще одно объяснение в пользу БХЭ-эффективности соединения V: из-за неспособности силатрана к ионизации соединение V не имеет катионондной группы, и это позволяет сорбироваться вне аннионного центра, а как указывалось выше, именно аннионный центр БХЭ предъявляет особенно высокие требования к комплементарности.

Взаимодействие с ХЭ особей командорского кальмара из разных зон обитания. Исследование субстратно-ингибиторной специфичности ХЭ командорского кальмара выявило своеобразие свойств этого фермента [14] по сравнению с реперными ХЭ—эритроцитной АХЭ и сывороточной БХЭ (табл. 3). Ткань зрительных ганглиев содержала только одну ХЭ [14]. Как по способности к гидролизу тиохолиновых эфиров, так и по чувствительности к достаточно широкому кругу необратимых ФОИ ХЭ особей кальмаров из разных зон обитания не проявили достоверных различий.

Известно, что взаимодействие субстратов и необратимых ФОИ с ХЭ приводит к ацилированию (фосфорилированию) тидроксила серина эстеразного центра ХЭ [1]. Полученные результаты дают основание предположить о сходстве окружения эстеразного центра ХЭ особей кальмаров и предпринять поиски различий с помощью эффекторов анионного центра, то есть ониевых обратимых ингибиторов [2—8]. Как показано выше, эти поиски увенчались успехом: обнаружены специфические ингибиторы ХЭ особей из разных зон обитания [3]. Для продолжения этих поисков силатрановые производные (соединения II—VI) были изучены как обратимые ингибиторы ХЭ зрительных ганглиев «южных», «западных» и «северных» особей командорского кальмара.

Таблица 3

Кинетические параметры взаимодействия силатрановых ингибиторов с ХЭ зрительных ганглиев особей командорского кальмара из разных зон обитания

Соединения	З о н ы о б и т а н и я											
	«южные»				«западные»				«северные»			
	$p\bar{K}_i$	pK_i	pK'_i	тт	$p\bar{K}_i$	pK_i	pK'_i	тт	$p\bar{K}_i$	pK_i	pK'_i	тт
II	3,85	3,60	3,50	н	4,59	4,54	3,61	с	4,21	4,18	3,32	с
III	4,92	4,80	4,31	с	4,45	—	4,45	б	4,20	—	4,20	б
IV	3,42	3,32	2,73	с	3,50	3,41	2,76	с	3,70	3,62	2,85	с
V	4,26	4,05	3,83	с	4,91	4,86	3,89	с	4,03	3,89	3,48	с
VI	2,91	2,88	1,95	с	3,17	3,13	2,11	с	2,50	2,80	2,21	с

Примечание. Типы торможения (тт): смешанный (с), неконкурентный (н), бесконкурентный (б).

Как видно из табл. 3, по чувствительности к ониевым ингибиторам (соединения II—IV) ХЭ кальмара занимала промежуточное положение, уступая АХЭ и превосходя БХЭ. Эффективность тионово-го ФОИ (соединение V) по отношению к ХЭ кальмара была существенно ниже, чем по отношению к БХЭ (в случае ХЭ «северных» это различие было 40-кратным).

Мы обнаружили определенные различия между чувствительностью ХЭ разных особей к ониевым ингибиторам (соединения II—IV): для «южных» — III > II > IV, для «западных» — II > III > IV, для «северных» — II = III > IV.

Таким образом, объем ониевой группировки (табл. 1) не во всех случаях был критерием эффективности. Кроме того, так называемый «силатрановый эффект» (ср. соединения III и VI) был для ХЭ кальмаров достаточно высок (аналогично АХЭ), особенно для ХЭ «южных» особей (в 100 раз). В связи с этим среди изученных ингибиторов выявлена определенная специфичность действия. Так, соедине-

ние II оказалось в 6 раз более сильным ингибитором ХЭ «западных» особей, чем «южных». Соединение III сильнее тормозило активность ХЭ «южных особей», причем здесь отмечалось торможение по смешанному типу, а для других ХЭ—по бесконкурентному типу.

Как отмечалось выше, тионовые обратимые ФОИ взаимодействуют главным образом с эстеразным центром ХЭ [7]. Весомым аргументом в пользу этого положения была одинаковая чувствительность к таким ФОИ у ХЭ особей командорского кальмара из разных зон обитания, в связи с тем, что у этих ХЭ предполагается одинаковое окружение эстеразного центра [7]. Соединение V свидетельствует о неоднозначности такого вывода: его эффективность по отношению к ХЭ «западных» особей была выше, чем к ХЭ других особей. Интересно, что эти различия (близкие к 10-кратным) за счет величины конкурентной составляющей K_i , то есть при взаимодействии непосредственно с активным центром ХЭ. По-видимому, здесь вносит свои коррективы силатрановая группа.

Таким образом, нами предпринято комплексное исследование силатрансодержащих элементоорганических обратимых ингибиторов ХЭ, показана роль ониевой группы с учетом уникальных различий в природе ониевого атома (азот, сера, селен, телур), оценено влияние на антихолинэстеразные свойства суперэлектроннодонорной силатрановой группировки в молекуле ониевых эффектов и тионового ФОИ. Подтверждена гетерогенность свойств ХЭ особей из разных зон обитания, что, видимо, связано с наличием внутривидовых группировок у этого вида командорского кальмара.

REVERSIBLE INHIBITORS OF COMMODORE SQUID OPTICAL GANGLIA CHOLINESTERASE: SILATRAN DERIVATIVES OF ELEMENTORGANIC COMPOUNDS

ROZENGART E. V., KOVALEV N. N., FEDORETZ Yu. A., SHESTAKOVA N. N.,
EPSHTEIN L. M., KHOVANSKIKH A. E.

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

The optical ganglia cholinesterase (CE) of commodore squid (*Berythodis magister*) represented in different zones of Bering sea was found to be inhibited reversibly by a group of new silatronic derivatives. Among the inhibitors investigated were onium compounds with different nature of heteroatom (nitrogen, sulfur, selenium, tellurium) and silatran-containing thionic organophosphorus inhibitor. The relationship between anti-CE properties of studied inhibitors and several geometric parameters of their molecules was shown. The heterogeneity in CE properties of squids representing different living zones was confirmed that possibly is connected with the presence of inter-species groups of commodore squid.

ЛИТЕРАТУРА

1. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахобов А. А., Асланов Х. А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. ФАН, Ташкент, 1976.
2. Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В., Хованских А. Е. — В сб.: Вопросы эволюционной физиологии, с. 126—127, Л., Наука, 1986.
3. Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 23, № 4, с. 548—550, 1987.
4. Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В., Хованских А. Е. — В сб.: Технологии гидробионтов, с. 46—54, Владивосток, ТИНРО, 1987.
5. Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В. — В сб.: Биологически активные вещества гидробионтов при комплексной утилизации ресурсов океана, с. 27—29, Владивосток, ТИНРО, 1988.
6. Розенгарт Е. В., Виняр Т. Н., Ковалев Н. Н., Хованских А. Е. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 24, № 5, с. 679—685, 1988.
7. Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В., Гафуров М. Б., Далимов Д. Н., Абдувахобов А. А. Изв. АН СССР, сер. биол., № 6, с. 926—929, 1988.
8. Розенгарт Е. В. — В сб.: Физиология морских животных, с. 77. Мурманск, Апатиты, 1989.
9. Long J. Handbuch exp. Pharmacol., B. 15, S. 374—427, 1963.
10. Розенгарт Е. В., Ковалев Н. Н., Хованских А. Е., Сорокин М. С., Воронков М. Г. Хим. фармацевт. журн., № 2, с. 170—172, 1989.
11. Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Розенгарт Е. В. Биохимия, т. 46, с. 1042—1048, 1981.
12. Бокий Г. Б. Кристаллохимия, с. 136—141, М., Химия, 1971.
13. Розенгарт Е. В., Жоров Б. С. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 25, № 2, с. 189—194, 1989.
14. Бресткин А. П., Ковалев Н. Н., Розенгарт Е. В., Хованских А. Е., Федорец Ю. А., Эпштейн Л. М. Нейрохимия, т. 5, № 3, с. 264—270, 1986.

Поступила 25. XII. 1990

УДК 577.152.344.037:612.82:613.863

КИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КАТЕПСИНА D ИЗ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ПЕРЕНЕСЕННОМ СТРЕССЕ

ЯКУШЕВ В. С., КРИСАНОВА Н. В.

Запорожский государственный медицинский институт

Методом аффинной хроматографии из больших полушарий головного мозга были выделены препараты катепсина D (К.Ф. 3.4.23.5) у здоровых животных и у крыс, перенесших эмоциональный стресс. В опытах *in vitro* установлено, что при перенесенном стрессе увеличивается сродство катепсина D к субстрату. Однако увеличение отношения K_m/V препаратов фермента, выделенных у крыс, перенесших эмоциональный стресс, свидетельствует о том, что протеолитическая функция катепсина D при перенесенном стрессе не реализуется полностью. В работе обсуждается вопрос о регуляторном воздействии на фермент со стороны кальция и cAMP.

В настоящее время известно, что различные виды стрессорного воздействия на организм приводят к изменению активности лизосомного аппарата клетки [1, 2]. Исследуемые факторы воздействия: облучение [3] и локальное охлаждение [4], кратковременная гипотермия [5], ионизирующая радиация [6], эмоционально-болевого стресс [7] приводят к лабильзации лизосомных мембран клеток тканей различных органов и выходу кислых гидролаз в цитозоль клетки, активации протеолиза. Стрессовые воздействия, повышающие функциональную активность лизосомных протеиназ, могут привести к изменению их физико-химических свойств.

Предметом проведенного нами исследования стало изучение кинетических свойств одного из наиболее активных протеолитических ферментов лизосом — катепсина D в больших полушариях мозга при эмоциональном стрессе, который является фактором риска в развитии ряда заболеваний стрессорной природы [1, 8].

Целью работы явилось, во-первых, изучение кинетических свойств катепсина D, выделенного из больших полушарий головного мозга здоровых животных и крыс, перенесших эмоциональный стресс; во-вторых, исследование активности препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга здоровых крыс и перенесших эмоциональный стресс при влиянии *in vitro* регуляторов активности фермента кальция и cAMP.

Материалы и методы

Опыты проводили на 40 крысах линии *Wistar* массой 150—200 г из больших полушарий головного мозга методом аффинной хроматографии выделяли препараты катепсина D. Аффинную хроматографию [6, 9] осуществляли с использованием сорбента гемоглобин-бюгеля-Р300, который синтезировали как описано Руослахти [10]. В качестве лиганда использовали перекристаллизованный бычий сывороточный гемоглобин [11]. Десорбцию фермента с колонки проводили со скоростью 8—10 мл/ч 0,1 М боратым буфером pH 8,6 с 1 М NaCl. Фракции, обладавшие активностью катепсина D, соединяли и диализовали против 0,1 М трис-HCl буфера с pH 7,2. Диализат концентрировали против полиэтиленгликоля ($M_r = 15000$), концентрат разводили 2 мл 0,1 М трис-HCl буфера с pH 7,2. Полученные препараты использовали для дальнейших исследований. Активность фермента определяли по методу Anson [12]. За единицу активности принимали количество фермента, вызывающего прирост экстинкции ТХУ-центрифугата на 1,0 в течение 1 ч [6, 9, 13]. Количественное определение белка проводили по методу Lowry и соавт. [14]. В методе определения эффективной величины K_m и V использовали концентрации гемоглобина 18, 40, 55, 92, 185 мкМ/л. Под эффективной K_m понимали сумму констант гидролиза всех пептидных связей, которые атакуются в составе полипептидных цепей гемоглобина и образуют ТХУ-растворимые продукты гидролиза. При данной заданной концентрации субстрата $[S]$, рассчитывали начальную скорость ферментативной реакции V_i , под которой понимали изменение оптической плотности ТХУ-центрифугата в единицу времени (мин). Затем, имея пары значений $[S]$ и V_i методом Эйзеншталь-Корниша-Бюудена [15] рассчитывали K_m и V .

В определении оптимума pH препаратов катепсина D использовали 50 мМ цитратный буфер в диапазоне 3,0—4,0. При изучении влияния кальция и cAMP на активность препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга использовали $[Ca^{2+}] = 10^{-6}$; 10^{-5} моль/л и $[cAMP] = 10^{-7}$; 10^{-6} моль/л.

Всех животных разделяли на группы: I—интактные животные; II—крысы, подвергнутые стрессу по Desiderato и соавт. [16] (OC); III—крысы, исследованные на 2-е сутки после перенесенного стресса (ПС); IV—животные, исследованные на 7-е сутки после ПС.

Результаты, полученные в работе, обрабатывали статистически.

Результаты и обсуждение

Степень очистки препарата катепсина D из больших полушарий головного мозга здоровых крыс по отношению к гомогенату составила 540. Величина У.А. препарата 59,5 ед/мг, выход по белку относительно гомогената—0,2%. 50%-ное ингибирование активности фермента пепстатином наблюдали при добавлении 0,9 мкг пепстатина в расчете на 1 мкг препарата фермента в 1 мл инкубационной смеси. Полученные данные согласуются с указанными в литературе [6, 17].

Данные по кинетическим свойствам препарата катепсина D из больших полушарий головного мозга интактных и перенесших стресс животных представлены в таблице. Указанные значения K_m и V препарата фермента соответствуют литературным данным [6, 17]. Оптимальный pH препарата фермента, по нашим данным, составляет для интактных животных 3,4. Эти результаты свидетельствуют об адекватности использованных методических подходов, предложенных в ряде работ [6, 9, 17].

Таблица
Константы Михаэлиса (K_m), максимальные скорости ферментативной реакции (V), отношение K_m/V для препаратов катепсина D, выделенных из больших полушарий головного мозга крыс в условиях остро перенесенного стресса ($n=8-10$)

Показатель	Интактные животные	ОС	ПС 2 суток	ПС 7 суток
$K_m \times 10^{-6} \text{ М}$	$37,3 \pm 3,8$	$9,7 \pm 1,8$	$16,8 \pm 2,3$	$13 \pm 1,6$
$V \times 10^{-4} \text{ М} \cdot \text{мин}^{-1}$	$72,4 \pm 2$	$11,3 \pm 0,6$	$10,8 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,2$
$K_m/V \times 10^{-2}$	0,51	0,86	1,55	2,32

Примечание. $p < 0,05$ по отношению к сроку ОС.

Анализ результатов по очистке методом аффинной хроматографии катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс, перенесших эмоциональный стресс, дает возможность сопоставить и оценить кинетические свойства полученных препаратов фермента только в указанных условиях эксперимента. Это связано с тем, что степень очистки препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс, перенесших стресс, варьировала от 43 до 97 по отношению к гомогенату. Выход фермента по белку по отношению к гомогенату составлял 0,66—1%. Величина У.А. препаратов фермента примерно на порядок ниже по сравнению с значением, указанным для препарата катепсина D, полученного от интактных животных. В условиях соблюдения аналогии в выполнении методических требований к очистке фермента по каждой серии эксперимента данные факты, возможно, объясняются тем, что при стрессе наблюдается перестройка в лизосомном аппарате клетки (увеличение числа и размеров лизосом) [18] в сочетании с активацией синтеза белков и уменьшением седиментирующей активности катепсина D в головном мозгу [18, 19].

Результаты по K_m свидетельствуют об увеличении свойства фермента к субстрату (гемоглобину) в период после ПС (III и IV группы) при сравнительно близких значениях V . Наиболее показательным является отношение K_m/V , которое при малых концентрациях субстрата является величиной, обратной кажущейся константе скорости взаимодействия субстрата с ферментом [20]; чем меньше отношение, тем быстрее вступает во взаимодействие фермент с субстратом. При ОС (II) отношение K_m/V в 1,4 раза меньше соответствующего значе-

ния для животных III группы, в 1,8 раза меньше соответствующего значения для IV группы. Данные соотношения свидетельствуют о более высоком уровне протеолитической активности катепсина D из больших полушарий головного мозга при остром стрессе по сравнению с постстрессорным периодом.

Именно в острый период стресса в условиях возрастания уровня ПОЛ в головном мозгу, значение которого для процесса активации протеолитических ферментов в клетке доказано [21, 1], возможно, увеличивается сродство катепсина D к нативным растворимым белкам головного мозга [22], к основному белку миелина, β -эндорфину, энкефалинам [23], субстанции P [24], тубулину головного мозга, белкам цитоскелета нейрофиламентов [25]. Постстрессорный период харак-

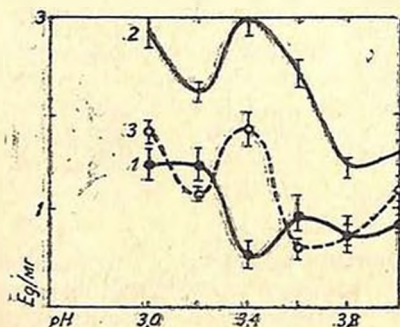


Рис. 1. Оптимум pH препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга, выделенных после перенесенного стресса. 1—острый стресс, 2—перенесенный стресс (2 суток), 3—перенесенный стресс (7 суток).

теризующийся изменением условий нейрогуморальной регуляции [1] по сравнению с ОС, способствует снижению каталитической активности катепсина головного мозга, что подтверждается данными таблицы и результатами авторов [19], полученных при изучении динамики изменения активности фермента в субклеточных фракциях при ОС и после него.

Из рис. 1 следует, что оптимум pH препарата катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс, перенесших острый стресс, лежит в диапазоне 3,0–3,2, а оптимум pH препаратов фермента, полученных из головного мозга крыс, подвергнутого исследованию в постстрессорный период (2-е, 7-е сутки) лежит в более широких пределах: 3,0–3,4. В настоящее время считают, что регуляция активности аспарагиновых протеиназ (в том числе и катепсина D) осуществляется в клетке путем изменения pH и концентрации белковых субстратов [26]. Очевидно, что катепсин D из больших полушарий головного мозга крыс в условиях острого эмоционального стресса должен быть более чувствительным к изменению внутриклеточного pH, что действительно имеет место при эмоциональном стрессе [19].

Вместе с тем известно, что при перенесенном стрессе в больших полушариях головного мозга увеличивается содержание ионов кальция и уменьшается концентрация cAMP [27]. Интересно было установить, могут ли данные факторы оказывать влияние на активность

препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс, выделенных в условиях перенесенного стресса.

Данные по изучению влияния Ca^{2+} на препараты катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс представлены на рис. 2, а. При изменении концентрации Ca^{2+} от 10^{-6} моль/л до 10^{-5} моль/л наблюдалось значительное ингибирование (от 54 до 87%) активности препарата фермента, полученного от интактных животных. Эти данные противоречат результатам [28], полученным при исследовании препаратов катепсина D из селезенки крыс. Такое противоречие можно было бы объяснить возможным присутствием в полученном нами

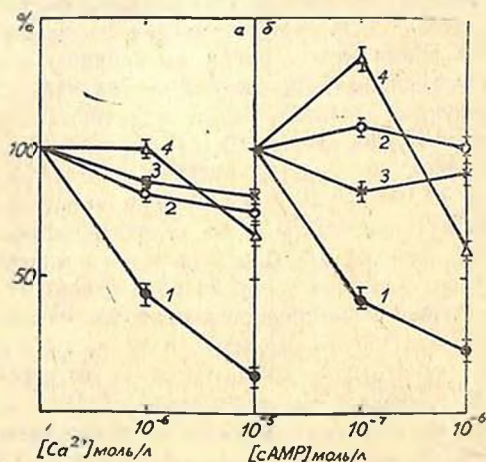


Рис. 2. Влияние кальция (а) и cAMP (б) на активность препаратов катепсина D из больших полушарий головного мозга после перенесенного стресса. 1—интактные животные, 2—острый стресс, 3—перенесенный стресс (2 суток), 4—перенесенный стресс (7 суток)

препарате малых количеств Ca^{2+} -зависимой протеиназы, способной подвергнуть эндогенному протеолизу катепсин D. Однако известно, что оптимум pH Ca^{2+} -зависимых протеиназ (кальпаинов) лежит в области нейтральных и слабо-щелочных значений [29], что позволяет сделать заключение о невозможности такого опосредованного влияния со стороны Ca^{2+} на катепсин D при соблюдении методических условий в проведенной нами работе. Для уточнения полученного эффекта, очевидно, необходимы дополнительные эксперименты.

В то же время, при таких же концентрациях Ca^{2+} активность препаратов катепсина D, выделенных при ОС и после его воздействия, уменьшается незначительно (рис. 2), хотя степень очистки препаратов значительно ниже, и примесь в виде других протеиназ должна быть значительно больше. Возможно, что в реальных условиях избытка кальция в цитозоле при ПС [27] данный фактор не оказывает влияния на неседиментирующую активность катепсина D головного мозга.

Данные по изучению влияния концентраций сАМР (10^{-7} и 10^{-6} моль/л) на препараты катепсина D из больших полушарий головного мозга крыс представлены на рис. 2, б. Изменение концентрации сАМР от 10^{-7} до 10^{-6} моль/л оказывало ингибирующее влияние (от 54 до 72%) на активность препарата фермента, полученного от здоровых животных. Препараты катепсина D, выделенного при ОС и на 2-е сутки после него, фактически не чувствительны к этим же концентрациям сАМР, что подтверждается динамикой изменения активности фермента, выделенного в указанные сроки (рис. 2).

На 7-е сутки после ПС наблюдается парадоксальная ситуация: [сАМР] = 10^{-7} моль/л увеличивает активность фермента на 36%, а [сАМР] = 10^{-6} моль/л уменьшает эту активность на 40%.

В настоящее время исследования по влиянию циклических нуклеотидов на лизосомальный аппарат клеток различных тканей ведутся достаточно интенсивно, однако работ, в которых рассматривается влияние этих веществ на катепсин D, не так уж много, а результаты противоречивы. Так, в работе Watabe, Terada и соавт. [30] изучено влияние сАМР, АМР, АДФ, АТР в концентрациях 2 мМ и 10 мМ на активность катепсина D из селезенки быка (в норме) по отношению к БСА при pH 4,6. Для всех указанных нуклеотидов наблюдали увеличение активности препарата фермента, причем концентрация 10 мМ оказывала более выраженное влияние, а [АТР] = 10 мМ увеличила активность фермента в 17 раз. Не доказано влияние циклических нуклеотидов на катепсин D из печени и семенных пузырьков. Было показано, что добавление сАМР к суспензии лизосом оказывает стабилизирующее влияние на лизосомальные мембраны, но угнетает лизосомальную активность катепсина D. Очевидно, что в решении вопроса о влиянии циклических нуклеотидов (даже в норме) на катепсин D важное значение имеют величины используемых концентраций сАМР, характер источника для получения препарата, методическая постановка эксперимента.

Известно, что протеолиз, осуществляемый катепсином D, является первичным звеном распада белков в клетке, после чего в этот процесс включаются катепсины B, H, L [23]. Полученные нами данные позволяют сделать вывод о том, что каталитическая функция катепсина в больших полушариях головного мозга после перенесенного стресса в целом снижена, что, по нашему мнению, имеет определенное значение в молекулярных механизмах нарушения белкового обмена в структурах головного мозга.

KINETIC PROPERTIES OF CATHEPSIN D FROM CEREBRAL HEMISPHERES OF RATS AFTER EMOTIONAL STRESS

YAKUSHEV B. S., KRISANOVA N. V.

Medical Institute, Zaporozhye

Preparations of Cathepsin D were isolated by affinity chromatography from cerebral hemispheres of healthy rats and rats subjected to

emotional stress. The affinity of Cathepsin D to its substrate increased after stress (K_m of the enzyme decreases). However, the increased K_m/V_{max} ratio characteristic of enzyme preparations isolated from rats subjected to the stress points out that proteolytic properties of Cathepsin D cannot be realized to a full extent after stress. We discuss the regulatory effect of Ca^{2+} and cAMP on Cathepsin D activity.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Паник Л. Е. Биохимические механизмы стресса, Новосибирск, 1983.
2. Розанов А. Я., Трецинюкий А. И., Хмелевский Ю. В. Ферментативные процессы и их коррекция при экстремальных состояниях, Киев, Здоров'я, 1985.
3. Ломакина Л. В., Шугалей В. С. Физiol. журн. СССР, т. 66, № 3, с. 400—403, 1980.
4. Белоусова Е. В., Сандомирский Б. П. Тезисы докл. 2-го Всесоюз. симпозиума «Структура и функции лизосом», с. 27—28, Новосибирск, 1980.
5. Forencikova J., Kolesar J. Allergie und Immunol. № 1, S. 122—128, 1982.
6. Березин В. А., Лоханская Н. И., Рева А. Д., Сенюк В. Н. Укр биохим. журн., т. 53, № 1, с. 54—59, 1981.
7. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца, М., Медицина, 1984.
8. Wattiax R., Wattiax-De Coninck S. Internat. Rev. Exper. Pathology (eds. Richter G., Epstein M.), N. Y., v. 26, p. 85—107, 1984.
9. Михеев А. А. Роль катепсина D в деградации белков. Автореф. канд. дисс. Киев, 1986.
10. Руослаhti Э. Иммуносорбенты в очистке белков, с. 45—49, М., Медицина, 1979.
11. Доорникова П. Д., Гулый М. Ф., Печенова Т. М., Укр. биохим. журн., т. 38, № 1, с. 100—104, 1966.
12. Anson M. L. J. Gen. Physiol., v. 22, p. 79—89, 1935.
13. Березин В. А., Рева А. Д., Шматченко Н. А., Коробов В. И. Биохимия, т. 44, № 6, с. 1030—1035, 1979.
14. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
15. Корниш-Бовден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1, 1979.
16. Desiderato A., Mackinnon I., Hisson H. J. Comp. Physiol. and Psychol., v. 87, № 1, p. 208—214, 1974.
17. Седых Н. И. Катепсин D головного мозга в норме и после рентгеновского облучения. Автореф. канд. дисс., Киев, 1984.
18. Паник Л. Е., Маянская Н. Н. Успехи соврем. биол., т. 92, вып. 1 (4), с. 64—77, 1981.
19. Меерсон Ф. З., Пшеничкова М. Г. Адаптация к стрессорным ситуациям и физическим нагрузкам, М., Медицина, 1988.
20. Диксон М., Узбб Э. Ферменты, т. 1, с. 104—105, М., Мир, 1982.
21. Богданова Е. Д., Каган В. Е., Кулиса И. Я. и др., Иммунология № 2, с. 65—66, 1981.
22. Оганисян А. И., Акопян Т. Н., Геворкян Г. А., Галоян А. А. Биол. журн. Армения, т. 32, № 8, с. 735—740, 1979.
23. Barret A. J. Fed. Proc., v. 39, № 1, p. 9—14, 1980.
24. Акорян Г. Н., Аргутинян А. А., Лаitha H., Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 3, № 1, p. 89—99, 1978.
25. Zuzuki H., Takeda M., Nakamura Y., Kato Y. et al. Neurosci. Lett., v. 89, № 2, p. 240—245, 1988.

26. Kay J., Valler M. J., Duhn B. M. Proteinase Inhibitors: Medical and Biological Aspects (eds. Katunuma N. et al.), p. 201—210, Jap. Sci. Soc. Press., Tokyo, 1983.
27. Якушев В. С., Курипка В. И., Давыдов В. В., Миронова Е. В. Вopr. мед. химии, т. 32, № 6, с. 93—96, 1986.
28. Yamamoto K., Katsuda N., Kato K. J. Eur. Biochem., v. 92, № 2, p. 499—508, 1979.
29. Suruki K., Ohno S., Emori V. et al. Intracellular protein catabolism: Abstracts of the 6th Symp. (eds. Aurich H. et al.), 141, p. 218—219. Haag, 1986.
30. Watake S., Terada A., Ikeda T., Kouryama H. et al. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 89, № 4, p. 1161—1167, 1979.
31. Строев Е. А., Дмитриев А. В., Макарова В. Г. Механизмы регуляции ферментов лизосом. Тезисы докл. V Всесоюзн. биохим. съезда, т. 2, с. 228—229, М., 1986.

Получила 7 V 1990

Neurotransmitters and Epilepsy (Eds. R. S. Fisher and J. T. Goyle), J. Wiley, Chichester, England, 270 p., 1991.

Нейротрансмиттеры и эпилепсия.

Книга имеет двойное назначение. Она предоставляет данные фундаментальных нейронаук клиницистам, желающим ознакомиться с научным обоснованием выбора путей лечения тех или иных заболеваний мозга. С другой стороны, она корректирует работу исследователей, нуждающихся в определенных критериях для точной диагностики наблюдаемой ими картины тех или иных клинических нарушений (например, эпилепсии). Оба рассматриваемых в книге объекта—нейротрансмиттеры и эпилепсия—затрагивают практически все разделы нейронаук, но основное внимание в ней уделяется следующим направлениям: «Вторичные мессенджеры и эпилепсия», «Механизмы антиэпилептического действия лекарственных препаратов», «Глутаматная система и рецепторы NMDA (N-метил-D-аспартата)», «Система ГАМК», «Адреналин, ацетилхолин, серотонин и опиаты». Книга содержит следующие главы: «Клинический обзор эпилепсии», «Механизмы действия рецепторов нейротрансмиттеров», «Возбудимость нейронов: роль систем вторичных мессенджеров», «Эффекторы действия системы вторичных мессенджеров», «Модели эпилепсии у животных», «ГАМК-ергическая функция, связь с феноменом припадков», «Ацетилхолин и эпилепсия», «Роль центральной норадренергической системы в возникновении припадков», «Глутамат и эпилепсия», «Рецепторы NMDA и ионные каналы», «Внеклеточные уровни аминокислот при эпилепсии», «Опийные пептиды и припадки», «Нейротрансмиттерные маркеры припадков у человека», «Локализация и количественная характеристика рецепторов нейротрансмиттеров в случае эпилепсии», «Действие антиэпилептических препаратов на рецепторы нейротрансмиттеров и ионные каналы».

Книга является очередным выпуском в серии «Новые области клинических нейронаук» («Frontiers of Clinical Neuroscience», т. 11).

УДК 577.352:616—006.487

ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ КУЛЬТИВИРУЕМОЙ КЛЕТКИ НЕЙРОБЛАСТОМЫ C 1300 С ИЗМЕНЕННЫМ ЛИПИДНЫМ СОСТАВОМ

ВОЛКОВ Г. Л.

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

На моделях культивируемых клеток мышинной нейробластомы C1300 N18 с направленно измененным липидным составом показано, что повышение или понижение содержания холестерина в плазматической мембране не сопровождается каким-либо нарушением ее нормальной микровязкости. Отмечается, что ранее обнаруженная перестройка липидного бислоя, вызванная изменением концентрации холестерина в плазматической мембране, носит характер компенсации уплотняющего эффекта холестерина. Обсуждается вопрос о роли холестерина и ацильных цепей липидов как основных агентов липидного бислоя в процессе компенсации возникающих возмущений микровязкости плазматической мембраны живой клетки.

Многочисленные эксперименты на искусственных и биологических мембранах свидетельствуют, что холестерин, введенный тем или иным способом в липидный бислой, вызывает увеличение его микровязкости [1—5]. С другой стороны, эксперименты, выполненные в опытах на ряде мембранных препаратов, противоречат, казалось бы, постулированному положению о холестерине как конденсирующем агенте. Garda, Brenner не обнаружили существенного увеличения микровязкости фракции микросом при накоплении в ней холестерина [6, 7]. Необходимо отметить, что ранее при исследовании транспорта $^{86}\text{Rb}^+$ из предварительно нагруженных изотопом клеток нейробластомы C1300 с повышенным или пониженным содержанием холестерина мы не установили изменений в базальном выходящем токе одновалентного катиона [8], что косвенно может свидетельствовать в пользу выводов Garda, Brenner. Кроме того, при исследовании клеток мышинной нейробластомы C1300 N18 с повышенным или пониженным содержанием холестерина нами показано, что активность ряда ферментов липидного обмена в плазматической мембране и клетке в целом зависит от уровня холестерина. Накопление /снижение холестерина в указанной мембране активирует /ингибирует лецитин:холестерин:ацетилтрансферазу и десатуразы высокомолекулярных ацильных цепей фосфолипидов, что приводит к накоплению /снижению в мембране эфиров холестерина, лизофосфатиднахолина и полиненасыщенных ацильных цепей липидов. Наряду с этим ингиби-

руется/активируется в клетке синтез собственного холестерина и насыщенных высокомолекулярных жирных кислот [9—14].

С нашей точки зрения эти холестеринзависимые процессы усилили ярко выраженный характер компенсации конденсирующего эффекта холестерина на липидный бислой плазматической мембраны [3].

Таким образом, разрешить возникающее противоречие можно было только в эксперименте по определению микровязкости плазматической мембраны клеток с измененным содержанием холестерина, что и явилось целью данной работы.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на культивируемых клетках мышинной нейробластомы C1300 N18, используя методические подходы, описанные ранее [8—12]. В результате инкубации с фосфатидилхолиновыми или фосфатидилхолинхолестеринновыми липосомами в заданных условиях получали жизнеспособные клетки с пониженным или повышенным содержанием холестерина [9—15]. Изменения в содержании липидов в клетке и мембранных фракциях регистрировали разработанными нами методами [16]. Контрольные клетки проводили через все процедуры, но без липосом.

Высокоочищенные плазматические мембраны и фракцию микросом выделяли по разработанному нами методу [17]. Приготовление проб и измерения поляризации флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена (ДФГТ) и перилена («Sigma», США) проводили в соответствии с методическими рекомендациями McVey и соавт. [18]. Степень эксимеризации бензофенантрена пирена («Sigma», США) измеряли по методу, описанному Макаровой и соавт. [19].

Результаты и обсуждение

Для определения микровязкости плазматической мембраны клеток нейробластомы C1300 N18 с измененным содержанием холестерина мы выбрали метод измерения поляризации флуоресценции ДФГТ и перилена, а также интенсивностей флуоресценции эксимеров и мономеров пирена. Чем вызвано использование именно этих зондов? Во-первых, ДФГТ и перилен при соблюдении определенных ограничений при приготовлении образцов характеризуют плотность упаковки углеводородных цепей бислоя [20]. Во-вторых, пирен характеризует два взаимосвязанных, но не одинаково изменяющихся параметра—плотность упаковки углеводородных цепей липидов и гидрофобный объем бислоя [20, 21]. В-третьих, три указанных зонда обычно располагаются в различных, но перекрывающихся зонах фосфолипидов: ДФГТ—глицеринный остаток и ацильные цепи, перилен—ацильные цепи, пирен—ацильные цепи и концевые метильные группы [20].

Данные по измерению поляризации флуоресценции ДФГТ и пери-

Таблица 1

Поляризация флуоресценции 1,6-дифенил-1,3,5-гексатриена в целых клетках, плазматической мембране и фракции микросом при инкубации клеткок мышинной нейробластомы С1300 N18 с липосомами различного состава (5,0 мкмоль фосфатидилхолина на 1 мл липосом); $M \pm m$

Липосомы	Время инкубации (мин)	Целые клетки (n=5)		Плазматическая мембрана (n=3)		Мембраны микросом (n=3)	
		поляризация	степень	поляризация	степень	поляризация	степень
Контроль	—	$0,209 \pm 0,008$	1,000	$0,319 \pm 0,019$	1,000	$0,248 \pm 0,017$	1,000
Фосфатидилхолиновые	15	$0,205 \pm 0,015$	0,981	$0,322 \pm 0,025$	1,009	$0,233 \pm 0,014$	0,980
	30	$0,201 \pm 0,011$	0,976	$0,307 \pm 0,034$	0,962	$0,237 \pm 0,021$	0,955
	45	$0,145 \pm 0,017^{**}$	0,605	$0,311 \pm 0,029$	0,978	$0,189 \pm 0,018^*$	0,762
	60	$0,139 \pm 0,018^{**}$	0,666	$0,295 \pm 0,027$	0,925	$0,175 \pm 0,025^*$	0,706
	75	$0,120 \pm 0,015^{***}$	0,574	$0,168 \pm 0,019^{**}$	0,527	$0,164 \pm 0,026^*$	0,661
	90	$0,093 \pm 0,011^{***}$	0,445	$0,162 \pm 0,028^{**}$	0,508	$0,138 \pm 0,029^*$	0,558
Фосфатидилхолинхолестериновые	15	$0,217 \pm 0,009$	1,038	$0,330 \pm 0,020$	1,034	$0,251 \pm 0,019$	1,012
	30	$0,223 \pm 0,017$	1,067	$0,316 \pm 0,017$	0,991	$0,264 \pm 0,023$	1,065
	45	$0,253 \pm 0,020$	1,211	$0,334 \pm 0,027$	1,047	$0,338 \pm 0,025^*$	1,404
	60	$0,296 \pm 0,011^*$	1,416	$0,382 \pm 0,029$	1,197	$0,350 \pm 0,029^*$	1,411
	75	$0,312 \pm 0,033^*$	1,493	$0,402 \pm 0,029$	1,260	$0,368 \pm 0,027^*$	1,484
	90	$0,321 \pm 0,034^*$	1,536	$0,398 \pm 0,016^*$	1,248	$0,362 \pm 0,030^*$	1,460

Примечание. Здесь и в табл. 2, 3 * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

лена, а также степени эксимеризации пирена — представлены в табл. 1—3. Важно отметить, что во всех экспериментах время затухания флуоресценции ДФГТ ($\tau=8,0-8,4$ нс), перилена ($\tau=5,4-5,8$ нс) и пирена ($\tau=46-51$ нс) практически не изменялось и соответствовало результатам подобных экспериментов [3, 18].

Обнаружение нами флуоресценции всех трех зондов во фракции микросом свидетельствует о проникновении их внутрь клетки и согласуется с литературными данными [22, 23].

Как следует из результатов, представленных в табл. 1—3, поляризация флуоресценции ДФГТ и перилена, а также степень эксимеризации пирена в целых клетках остается неизменной в течение очень короткого времени инкубации с липосомами (не более 30 мин), что соответствует увеличению содержания холестерина на 10—11% или снижению его концентрации на 9—10% в целой клетке. При дальнейшем изменении концентрации стерина в клетке параметры флуоресценции зондов соответственно резко изменяются. Параллельно параметрам поведения зондов в целой клетке регистрируется повышение или снижение поляризации флуоресценции ДФГТ и перилена, а также степени эксимеризации пирена в мембранах фракции микросом. При концентрации стерина во фракции микросом от +12 до +143% поляризация флуоресценции ДФГТ возрастает от 10 до 50%, а перилена от 10 до 35%; степень эксимеризации пирена снижается от 15 до 70%. В случае снижения концентрации стерина от —20 до —60% поляризация флуоресценции ДФГТ снижается на 25—45%, перилена на 10—40%; степень эксимеризации пирена возрастает на 20—50%.

Эти данные свидетельствуют об изменении плотности упаковки ацильных цепей фосфолипидов, то есть о повышении микровязкости мембран микросом при накоплении в них холестерина и её снижении при удалении из них стерина.

Поведение зондов в плазматической мембране клеток в течение всего времени накопления или снижения содержания в ней холестерина не изменяется. Следует учесть, что максимально возможное изменение содержания холестерина в плазматической мембране клеток нейробластомы C1300 N18 достигается уже через 10—30 мин при инкубации с липосомами различного состава [11—15].

Таким образом, поведение флуоресцентных зондов в процессе изменения содержания холестерина при измерениях на целой клетке фактически зависит от поведения зондов во фракции микросом и повышения или понижения микровязкости последней в связи с изменением в ней содержания холестерина. Действительно, в период накопления/снижения холестерина в плазматической мембране (10—30 мин инкубации с липосомами) изменений в параметрах флуоресценции зондов мы не наблюдали, так как в этот период еще не осуществлялся трансмембранный перенос холестерина (плазматическая мембрана-микросомы) [9—14]. Как только холестерин начинал

Таблица 2

Поляризация флуоресценции перилена в целых клетках, плазматических мембранах
и фракции микросом при инкубации клеток мышечной нейробластомы C1300 N18
с липосомами различного состава (5,0 мкмоль фосфатидилхолина
на 1 мл липосом), $M \pm m$

Липосомы	Время инкубации (мин)	Целые клетки (n=5)		Плазматические мембраны (n=)		Мембраны микросом (n=)	
		поляризация	степень	поляризация	степень	поляризация	степень
Контроль	—	$0,078 \pm 0,006$	1,000	$0,118 \pm 0,004$	1,000	$0,206 \pm 0,007$	1,000
Фосфатидил- холиновые	15	$0,076 \pm 0,007$	0,974	$0,117 \pm 0,007$	0,992	$0,211 \pm 0,008$	1,024
	30	$0,082 \pm 0,006$	0,795	$0,110 \pm 0,004$	0,932	$0,193 \pm 0,006$	1,937
	45	$0,041 \pm 0,006^{**}$	0,523	$0,123 \pm 0,005$	1,042	$0,131 \pm 0,004^{***}$	0,650
	60	$0,034 \pm 0,005^{**}$	0,436	$0,105 \pm 0,012$	0,893	$0,117 \pm 0,006^{***}$	0,568
	75	$0,02 \pm 0,003^{***}$	0,282	$0,081 \pm 0,009^{**}$	0,686	$0,122 \pm 0,007^{***}$	0,592
	90	$0,014 \pm 0,003^{***}$	0,179	$0,074 \pm 0,003^{***}$	0,627	$0,12 \pm 0,004^{***}$	0,583
Фосфатидил- холинхолес- териновые	15	$0,074 \pm 0,005$	1,940	$0,112 \pm 0,003$	0,949	$0,201 \pm 0,007$	0,976
	30	$0,083 \pm 0,005$	1,128	$0,116 \pm 0,005$	0,983	$0,207 \pm 0,008$	1,005
	45	$0,099 \pm 0,006^*$	1,269	$0,121 \pm 0,011$	1,025	$0,263 \pm 0,016^*$	1,277
	60	$0,108 \pm 0,007^*$	1,359	$0,123 \pm 0,006$	1,042	$0,269 \pm 0,001^{***}$	1,403
	75	$0,118 \pm 0,010^{**}$	1,513	$0,168 \pm 0,005^{***}$	1,421	$0,291 \pm 0,016^{**}$	1,413
	90	$0,132 \pm 0,013^{**}$	1,692	$0,163 \pm 0,006^{***}$	1,481	$0,283 \pm 0,013^{**}$	1,374

Таблица 3

Степень эксимеризации пирена (выражена отношением интенсивностей флуоресценции эксимерной и мономерной форм, I_3/I_1) в целых клетках, плазматических мембранах и фракции микросом при инкубации клеток мышинной нейробластомы C1300 N18 с липосомами различного состава (5,0 мкмоль фосфатидилхолина на 1 мл липосом), $M \pm m$

Липосомы	Время инкубации (мин)	Целые клетки $n=5$		Плазматические мембраны. $n=3$		Мембраны микросом $n=3$	
		степень эксимеризации	соотношение	степень эксимеризации	соотношение	степень эксимеризации	соотношение
Контроль	—	$0,603 \pm 0,027$	1,000	$0,762 \pm 0,031$	1,000	$0,814 \pm 0,026$	1,000
Фосфатидил-холиновые	15	$0,589 \pm 0,034$	0,992	$0,784 \pm 0,032$	1,029	$0,829 \pm 0,012$	1,018
	30	$0,718 \pm 0,029^*$	1,191	$0,769 \pm 0,037$	1,009	$0,962 \pm 0,041^*$	1,182
	45	$0,764 \pm 0,021^*$	1,267	$0,770 \pm 0,052$	1,010	$1,103 \pm 0,084^*$	1,355
	60	$0,790 \pm 0,043^{**}$	1,310	$0,789 \pm 0,043$	1,035	$1,173 \pm 0,076^{**}$	1,447
	75	$0,838 \pm 0,051^{**}$	1,390	$0,846 \pm 0,041$	1,110	$1,206 \pm 0,088^{**}$	1,482
	90	$0,907 \pm 0,064^{**}$	1,504	$0,938 \pm 0,049^*$	1,231	$1,200 \pm 0,072^{**}$	1,474
Фосфатидил-холинхопестеринные	15	$0,590 \pm 0,036$	0,978	$0,794 \pm 0,053$	1,042	$0,800 \pm 0,068$	0,983
	30	$0,482 \pm 0,020^{**}$	0,799	$0,751 \pm 0,038$	0,986	$0,591 \pm 0,043$	0,849
	45	$0,389 \pm 0,028^{***}$	0,645	$0,759 \pm 0,033$	0,996	$0,562 \pm 0,029^{**}$	0,690
	60	$0,305 \pm 0,023^{***}$	0,506	$0,775 \pm 0,042$	1,017	$0,448 \pm 0,037^{**}$	0,538
	75	$0,223 \pm 0,019^{***}$	0,370	$0,613 \pm 0,039^*$	0,804	$0,351 \pm 0,024^{***}$	0,431
	90	$0,164 \pm 0,012^{***}$	0,305	$0,428 \pm 0,030^{**}$	0,562	$0,212 \pm 0,028^{***}$	0,260

поступать извлекаться из фракции микросом, немедленно менялись параметры флуоресценции зондов в целой клетке. Близкий к этому результат был получен McVey и соавт. [18] при изучении поляризации флуоресценции ДФГТ и перилена в EL4 клетках, выращенных на различных насыщенных и ненасыщенных жирных кислотах. Авторы при обнаружении накопления в плазматической мембране различных жирных кислот (от 6,7 до 40,3%) изменений в степени поляризации зондов не зарегистрировали, однако получили достоверные различия на целой клетке. Мы пришли к заключению, что изменения поляризации флуоресценции на целых клетках при использовании ДФГТ и перилена не дают объективной информации о физическом состоянии плазматических мембран. Такие же выводы из подобных исследований сделали и другие авторы [24, 25], предположив, что флуоресцентные исследования на целой клетке суммируют информацию и о физическом статусе внутриклеточных липидных компартментов. Наши исследования убедительно показывают, что существует достаточно близкая корреляция изменения в поведении зондов целой клетки и фракции микросом. Это указывает на то, что состояние липидного бислоя микросом (и, по-видимому, всех эндоплазматических мембран) вносит основную информацию при флуоресцентных исследованиях на целой клетке.

Выше было отмечено, что микровязкость плазматической мембраны клеток нейробластомы C1300 N18 при изменении в ней концентрации холестерина не изменяется. Но нельзя оставить без внимания разительные изменения поляризации флуоресценции и степени эксимеризации зондов в плазматической мембране в последние сроки инкубации с липосомами (75—90 мин). Эти изменения непосредственно не связаны с повышением или снижением содержания холестерина в плазматической мембране [9—14]. Скорее всего, происходит следующее. Первые 60 мин инкубации повышенное или пониженное содержание холестерина в плазматической мембране компенсируется работой ферментов липидного обмена, трансмембранным переносом холестерина, а также ингибированием/активированием ферментных систем микросом, ответственных за синтез собственного холестерина и высокомолекулярных жирных кислот. Однако к 75-ой мин инкубации механизмы компенсации полностью исчерпывают собственные резервы. И теперь любое дополнительное встраивание/извлечение холестерина плазматическая мембрана компенсировать не в состоянии, так как все резервы исчерпаны, и наступает гибель клетки [11—15]. Таким образом, изменения в поведении зондов в плазматической мембране через 75—90 мин инкубации клеток с липосомами отражают физическое состояние липидного бислоя уже погибшей клетки, то есть ситуацию, когда все возможные резервы компенсации исчерпаны.

Понятно, что при нормальном состоянии организма холестерин поступает в клетку в количествах далеко не стабильных (больших или меньших), но в среднем также нормальных. И обнаруженные

компенсаторные реакции [13], прежде всего лецитинхолестерилацил-трансферазная, а затем десатуразные и элонгазные, являясь обратимыми, могут быстро «ремонтировать» отклонения в микровязкости плазматической мембраны. Постоянная флуктуация активности указанных систем является нормальной для живой клетки и не должна приводить к резким нарушениям функций плазматической мембраны.

Как нами ранее было установлено, холестерин в плазматической мембране функционально разделен как минимум на три пула: структурный, обмениваемый и прочно (ковалентно) связанный с белками [11, 12, 14]. Причем, структурный и обмениваемый могут подвергаться этерификации [9—15]. Но, с нашей точки зрения, обмениваемый холестерин этерифицируется в процессе транспорта через мембрану, а структурный только в случае компенсации возникающих возмущений микровязкости мембраны. Однако это предположение нуждается в дальнейшей экспериментальной проверке.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что холестерин и ацильные цепи липидов живой клетки выполняют важнейшую функцию, а именно, посредством обратимой модификации соответствующими ферментными системами осуществляют регуляцию микровязкости липидного бислоя плазматической мембраны.

PHYSICAL PROPERTIES OF PLASMA MEMBRANE OF CULTIVATED NEUROBLASTOMA C 1300 CELL WITH MODIFIED LIPID COMPOSITION

VOIKOV G. L.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian Academy of Science, Kiev

Using the mouse neuroblastoma C 1300 cells with modified content of cholesterol we showed that plasma membrane fluidity of these cells did not depend from cholesterol level. Earlier found lipids reconstruction stimulated by abnormal cholesterol level was directed to compensate the condensing effect of cholesterol. The physiological role of lipid acyl chains and cholesterol as general agents of bilayer in the compensation of the appearing plasma membrane fluidity defects is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Feinstein M. B., Fernandez S. M., Sha'afi R. I. *Biochim. et biophys. acta*, N 3, p. 314—370, 1975.
2. Cogan U., Shinitzky M., Weber G., Nishida T. *Biochemistry*, N 3, p. 521—528 1973.
3. Galia H.—J., Sackmann E. *Biochim. et biophys. acta*, N 1, p. 103—115, 1974.
4. O'driscoll E., Chapman D. *FEBS Lett.*, N 3, p. 303—306, 1972.
5. Vanderkooi J., Fischkoff S., Chance B., Cooper R. A. *Biochemistry*, N 8, p. 1589—1595, 1974.
6. Garda H. A., Brenner R. R. *Biochim. et biophys. acta*, N 1, p. 45—54, 1985.
7. Garda H. A., Brenner R. R. *Biochim. et biophys. acta*, N 1, p. 160—170, 1984.

8. Гулая Н. М., Волков Г. Л., Лишко В. К. Укр. биохим. журн., № 1, с. 44—48, 1986.
9. Волков Г. Л., Гулая Н. М., Говсеева Н. Н., Артеменко И. П. Цитология, № 9, с. 1064, 1984.
10. Гулая Н. М., Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Артеменко И. П. Укр. биохим. журн., № 1, с. 39—43, 1986.
11. Волков Г. Л., Худякова Н. А., Гулая Н. М., Артеменко И. П. Биол. мембраны, № 2, с. 185—190, 1986.
12. Гулая Н. М., Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Артеменко И. П. Укр. биохим. журн., № 4, с. 64—69, 1987.
13. Волков Г. Л., Худякова Н. А., Говсеева Н. Н., Гулая Н. М. Докл. АН УССР, сер. Б, № 4, с. 31—37, 1990.
14. Gu'aya N. M., Vol'kov G. L., Klimashe'sky V. M. et al. Neuroscience, v. 34, N 3, p. 785—792, 1990.
15. Волков Г. Л., Гулая Н. М., Говсеева Н. М. Укр. биохим. журн., т. 61, № 6, с. 69—75, 1989.
16. Волков Г. Л. Укр. биохим. журн., т. 61, № 6, с. 76—89, 1989.
17. Волков Г. Л. Укр. биохим. журн., т. 61, № 5, с. 71—77, 1989.
18. McVey E., Yguerabide J., Hanson D. C., Clark W. R. Biochim. et biophys. acta, v. 652, N 1, p. 106—118, 1981.
19. Макарова Т. Б., Королев Н. П., Гуськова Р. А. Биофизика, т. 32, в. 5, с. 787—793, 1988.
20. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. — В кн.: Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран, М., Наука, 1980.
21. Болдырев А. А., Лопика О. Д., Прокопьева В. Д. Нейрохимия, т. 4, № 1, с. 80—95, 1985.
22. Van Hoeyn P. P., Van Blitterswijk W. J., Emmelot P. Biochim. et biophys. acta., v. 551, N 1, p. 44—44, 1979.
23. Van Blitterswijk W. J., Emmelot P., Hakman H. A. M. et al. Biochem. et biophys. acta., v. 467, N 3, p. 309—310, 1977.
24. Esko J., Gilmore J., Glaser M. Biochim. et biophys. acta, v. 689, № 3, p. 562—568, 1982.
25. Pessin J., Satter D., Glasser M. Biochemistry, v. 17, N 10, p. 1997—2004, 1978.

Поступила 5. VII. 1990

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.8.009.24:615.217].001.5

СВЯЗЫВАНИЕ [^3H]ГАМК И [^{35}S]TBPS С СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ СУДОРОГ, ВЫЗВАННЫХ ГАМК-ЛИТИКАМИ

ГОЛОВКО А. И.

Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинград

Судороги различного генеза нарушают функциональное состояние рецепторов нейромедиаторных систем мозга [1, 2]. Это касается как плотности рецепторов, так и их сродства к лигандам. ГАМК, являющаяся основным тормозным нейромедиатором в головном мозгу млекопитающих [3], вовлечена в процессы инициации и поддержания судорожных приступов [4]. Изменения функционального состояния ГАМК_A-рецепторов при судорогах, вызванных ГАМК-литиками, в частности бикукуллином и пикротоксином, изучены недостаточно. Выяснению этого вопроса посвящено настоящее исследование.

Опыты выполнены на белых крысах-самцах массой 160—220 г. Бикукуллин («Sigma», США) и пикротоксин («Serva», ФРГ) растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) и вводили внутривентрикулярно в дозе 8 мг/кг. Контрольным животным вводили эквивалентное количество растворителя. Крыс декапитировали на 10-й мин после инъекции бикукуллина (длительность судорог— $7,8 \pm 0,3$ мин) и на 20-й мин после инъекции пикротоксина (длительность судорог— $9,2 \pm 0,7$ мин). Выделение синаптических мембран из ткани головного мозга (исключая мозжечок и ствол) для опытов с [^3H]ГАМК осуществляли, как описано в работе Кузнецова и соавт. [5].

Радиолигандный анализ. Инкубационная среда содержала мембранный препарат (320—420 мкг белка), 10 мМ трис-НСl буфер, рН 7,4, [^3H]ГАМК («Изотоп», СССР, 1530 ТБк/моль) в концентрациях 1—20 нМ. Общий объем инкубационной среды—1,0 мл. Неспецифическое связывание оценивали в присутствии 10 мМ ГАМК («Reanal», Венгрия). Пробы инкубировали 20 мин при температуре 0—3°. Далее содержимое пробирок переносили на фильтры GF/B («Whatman», Англия) и промывали 10 мл ледяного буфера. Подготовку мембран фронтальной коры, стриатума и мозжечка для изучения специфического связывания [^{35}S] t-бутилпициклофосфотрионата ([^{35}S] TBPS, NEN, ФРГ; 4,8 ТБк/мМ, 2 нМ) и ход анализа проводили по

методу, описанному ранее [6]. Фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы, содержащие сцинтилляционную жидкость ЖС-8. Радиоактивность подсчитывали на счетчике Rackbeta 1217—802. Параметры специфического связывания [^3H] ГАМК определяли по результатам 5—6 отдельных экспериментов. Данные о связывании [^{35}S]TBPS получены в 3—6 экспериментах. Все опыты проведены в двойных параллелях. Содержание белка в пробах оценивали по Lowry [7]. Кинетические характеристики специфического связывания [^3H] ГАМК рассчитывали в координатах Скэтчарда с использованием линейного парного регрессионного анализа методом наименьших квадратов на ЭВМ ЕС-1841.

В табл. 1 представлены данные о специфическом связывании [^3H] ГАМК с синаптическими мембранами головного мозга крыс после судорог, вызванных ГАМК-литиками. Судороги, вызванные пикротокином, не сопровождались достоверными изменениями параметров связывания лиганда. Бикукуллин повышал сродство рецепторов к лиганду. Это выражалось в снижении значения K_d на 31% в сравнении с контролем. Плотность рецепторов ГАМК (B_{max}) в обоих случаях оставалась в пределах исходных значений, что может свидетельствовать об относительной стабильности данного показателя при судорогах, вызванных ГАМК-литиками. Повышение сродства рецепторов к лиганду при воздействии бикукуллина может отражать развитие компенсаторных изменений ГАМК-ергических структур мозга. Не следует также забывать о возможности аллостерической модуляции низкоаффинных мест специфического связывания [^3H] ГАМК бикукуллином. Подобный механизм маловероятен в отношении пикротокина, так как данный ГАМК-литик связывается внутри хлор-ионного канала ГАМК-рецептора [8].

В табл. 2 отражены данные экспериментов по изучению специфического связывания [^{35}S]TBPS с синаптическими мембранами различ-

Таблица 1

Кинетические характеристики связывания [^3H] ГАМК с мембранами мозга крыс после судорог, вызванных ГАМК-литиками ($n=5$)

Вещество	K_d , нМ	B_{max} , фМ/мг белка
Д-метилсульф. оксид	$22,0 \pm 1,4$	$539,5 \pm 44,2$
Пикротокин	$23,3 \pm 4,1$	$604,9 \pm 59,4$
Бикукуллин	$15,2 \pm 2,0^*$	$555,8 \pm 62,1$

Примечание. * $p < 0,02$.

ных участков головного мозга крыс после судорог, вызванных бикукуллином. Во фронтальной коре и стриатуме изменений связывания лиганда не выявлено. В мозжечке отмечалось достоверное повышение данного показателя после введения бикукуллина. Эти изменения могут быть обусловлены функциональной перестройкой хлор-ионофора в

процессе развития судорожного синдрома. По-видимому, места связывания [^{35}S]TBPS во фронтальной коре и стриатуме, с одной стороны, и мозжечке, с другой, функционально различаются. Маловероятно, что изменения связывания лиганда обусловлены влиянием следовых количеств ГАМК-литиков, так как перед радиолигандным анализом мембраны подвергались интенсивному отмыванию, а бикукуллин не относится к алкилирующим агентам [9].

Таблица 2

Специфическое связывание [^{35}S] TBPS (2 нМ) с синаптическими мембранами различных структур головного мозга крыс после судорожного воздействия ГАМК-литиков (n=6)

Вещество	Связывание [^{35}S] TBPS, ф.м/мг белка		
	фронтальная кора	стриатум	мозжечок
Диметилсульфоксид	101,6 $\pm$ 7,1	66,2 $\pm$ 6,2	71,1 $\pm$ 4,2
Бикукуллин	95,2 $\pm$ 12,6	61,5 $\pm$ 4,5	82,6 $\pm$ 1,8*

Примечание. * $p < 0,05$.

Состояние ГАМК-рецепторного комплекса мозга при судорогах, вызванных ГАМК-литиками, остается недостаточно изученным. Вместе с тем, получены данные о возможности модуляции различных участков этого комплекса ГАМК-тропными препаратами. Так, антагонист бензодиазепиновых рецепторов FG-7142, вызывавший при хроническом введении киндлинг у мышей, понижал специфическое связывание [^{35}S]TBPS в коре больших полушарий. При этом в мозжечке и гиппокампе такой эффект отсутствовал [10]. Длительное введение блокатора хлор-ионного канала ГАМК $_A$ -рецептора пикротоксина (в течение 10 дней) сопровождалось снижением числа мест связывания [^{35}S]TBPS на мембранах мозга крыс. При однократном введении яда, напротив, отмечали повышение связывания лиганда [11]. ГАМК-рецепторный комплекс ретикулярной части черной субстанции мозга крыс оказался достаточно устойчивым к хроническим кортикальным судорогам, вызываемым электрошоком. В указанной области не отмечалось нарушений специфического связывания [^3H]мусцимола и [^3H]флуниотразепама [1]. Бикукуллин повышал сродство рецепторов к лиганду. Судороги, вызванные бикукуллином, сопровождалось усилением специфического связывания [^{35}S]TBPS с синаптическими мембранами мозжечка. Во фронтальной коре и стриатуме изменений этого показателя не отмечалось. Выявленные нарушения могут отражать компенсаторные изменения ГАМК-ионотропного комплекса в процессе развития судорог, вызванных бикукуллином.

THE BINDING OF [^3H]GABA AND [^{35}S]TBPS TO RAT BRAIN SYNAPTOSOMAL MEMBRANES AFTER GABA ANTAGONISTS-INDUCED SEIZURES

GOLOVKO A. I.

Medical Military Academy, Leningrad

We studied changes in high affinity [^3H]GABA and [^{35}S]TBPS binding by preparations of rat brain synaptosomes after seizures induced in rats by administration of picrotoxin and bicuculline. No alterations in the maximal binding capacity (B_{max}) of [^3H]GABA in rat brain synaptosomal membranes was detected after picrotoxin induced seizures. However, bicuculline administration led to a 31% decrease in K_d . The binding of [^{35}S]TBPS increased after bicuculline administration in cerebellum but not in striatum or frontal cortex. The [^{35}S]TBPS binding sites in cerebellum probably are functionally different from those in the frontal cortex and striatum.

ЛИТЕРАТУРА

1. Santori E. M., Collins R. C. Brain Res., v. 442, № 2, p. 261—269, 1983.
2. Schneider P., Girardi E., Rodriguez de Gzorgina, Lores A. Commun. Biol., v. 7, № 2 p. 105—112, 1989
3. Равский К. С., Георгиев В. П. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрохимические аспекты, М., Медицина, 1986.
4. Lazarova M., Roussinov K. Acta physiol. et pharmacol. bulg., v. 8, № 1—2, p. 78—83, 1982.
5. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Ким О. Н., Асланов Х. А. Укр. биохим. журн., т. 54, № 4, с. 428—431, 1982.
6. Wong D. T., Threlkeld P. G., Bymaster F. P., Squires R. F. Life Sci., v. 34, № 9, p. 853—860, 1984.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
8. Inoue M., Akaike N. Neurosci. Res., v. 5, № 5, p. 380—394, 1988.
9. Levin A. H., de Costa B. R., Rice K. C., Skolnick P. Mol. pharmacol., v. 35, № 2, p. 189—191, 1989.
10. Levin E., Paris J., Bleck V., Za'niser N. R., Harris R. A. Eur. J. Pharmacol., v. 160, № 1, p. 101—106, 1989.
11. Ho Y., Lim D. K., Nabeshima T., Ho J. K. J. Neurochem., v. 52, № 4, p. 1064—1070, 1989.

Поступила 5. VI. 1990

КОРРЕЛЯЦИЯ МЕЖДУ КОЛИЧЕСТВОМ СЕРОТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПЕРВОГО ТИПА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ И АГРЕССИВНЫМ ПОВЕДЕНИЕМ САМЦОВ МЫШЕЙ

МАСЛОВА Г. Б., КУЛИКОВ А. В.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Серотониновые рецепторы первого типа (С1 рецепторы), характеризующиеся высоким сродством к серотонину и его агонистам [1], участвуют в ауторегуляции серотонинергической системы мозга [2]. Рецепторы, расположенные на телах серотониновых нейронов (С1А рецепторы), подавляют активность последних [2, 3]. С1 рецепторы, локализованные на окончаниях серотониновых нейронов (С1В рецепторы), регулируют выход медиатора в синаптическую щель [2—4]. Можно предположить, что через С1 рецепторы реализуется влияние серотонинергической системы на выраженность контролируемых серотонином форм поведения. В настоящее время не возникает сомнения в той значительной роли, которую играет серотонинергическая система головного мозга в регуляции агрессивного поведения [5]. Ранее мы показали, что С1 рецепторы принимают прямое участие в регуляции межсамцовой агрессии мышей [6]. Возникает закономерный вопрос: существует ли связь между количеством С1 рецепторов в мозгу и выраженностью агрессивного поведения. Широкие возможности для выявления различного рода коррелятивных связей предоставляют инбредные мыши. Различаясь генетически, животные отдельных линий отличаются по поведенческим и нейрохимическим характеристикам. Сопоставление этих характеристик дает возможность выявить коррелятивные связи между ними и выделить как генетически обусловленный компонент, так и чисто функциональные связи. Цель работы состояла в изучении взаимосвязи между количеством С1 рецепторов в мозгу и выраженностью межсамцовой агрессии на мышах инбредных линий.

Опыты проводили на половозрелых самцах (возраст 2 месяца, масса 20 г), содержащихся в стандартных условиях вивария в группах по 10 особей. За два дня до экспериментов животных изолировали, чтобы снять влияние группового эффекта. Мышей тестировали на агрессивность, подсаживая к ним в клетки самцов аутбредных мышей (возраст 2 месяца, масса 20 г). Самцы, нападавшие на подсаженную мышь в течение 10 мин, квалифицировались как агрессивные. После начала агрессивного контакта самцам позволяли драться

2 мин, и за это время определяли длительность агрессивной реакции. Самцы, которые не проявляли агрессивного поведения в течение 10 мин, характеризовались как неагрессивные [7]. Количество С1 рецепторов в коре мозга и гиппокампе оценивали по $V_{\max}$ специфического связывания [^3H]серотонина («Amersham», Англия) выделенными из них препаратами мембран. Мозг гомогенизировали в 80 объемах холодного буфера (0,05 М трис- HCl , pH 7,6, 0,135 М NaCl , $5 \cdot 10^{-3}$ М KCl , $2 \cdot 10^{-3}$ М CaCl_2 , 10^{-3} М MgCl_2), гомогенаты инкубировали 15 мин при 37° , чтобы разрушить эндогенный серотонин, и центрифугировали 30 мин при 18000g (4°). Осадок мембран суспендировали в том же буфере, в который был добавлен паргиллин в конечной концентрации 10^{-5} М, и суспензию из каждого отдела мозга 10 мышей одной линии объединяли. Для определения величины $V_{\max}$ суспензию инкубировали 10 мин при 37° с 36 различными концентрациями [^3H]серотонина (от 10^{-9} до $6 \cdot 10^{-8}$ М). Инкубацию останавливали, быстро фильтруя пробы через стекловолокнистые фильтры GF/B («Whatman», Англия) под вакуумом. Фильтры трижды промывали порциями холодного буфера по 5 мл и их радиоактивность измеряли на сцинтилляционном счетчике с эффективностью 35%. Общее связывание [^3H]серотонина препаратами мембран выражали в фемтомолях метки на мг белка. Величину $V_{\max}$ оценивали по кривой зависимости общего связывания [^3H]серотонина от концентрации последнего с помощью нелинейного метода наименьших квадратов [8, 9]. Величину коэффициента межлинейной корреляции между признаками оценивали по Спирмэну [10].

Данные, представленные в таблице, указывают на положительную межлинейную корреляцию между величиной $V_{\max}$ специфического связывания [^3H]серотонина в коре ($r_s = 1,0$, $p < 0,01$) и в гиппокампе ($r_s = 0,8$, $p < 0,1$) и процентом агрессивных самцов в линии. Чем выше рецепторное связывание [^3H]серотонина в мозгу мышей, тем более они предрасположены к нападению на подсаженного самца. Ранее было показано, что повышение концентрации серотонина в нейроне или в синаптической щели ведет к резкому уменьшению доли агрессивных животных у мышей линии C57BL/6 [6]. В то же время, антагонист С1 рецепторов LSD-25 блокировал угнетающее действие медиатора на агрессивное поведение [6]. Повышенное содержание С1 рецепторов в мозгу мышей линий, характеризующихся высоким процентом агрессивных животных, хорошо согласуется с этими результатами, что позволяет сделать заключение о существенной роли рецепторов этого типа в регуляции внутривидовой агрессии самцов мышей. Известно, что С1 рецепторы ингибируют функциональную активность серотониновых нейронов [11]. Поэтому у животных с генетически закрепленным высоким содержанием С1 рецепторов в мозгу будет подавлена ингибирующая функция серотонинергической системы, вследствие чего чаще будет проявляться агрессивное поведение.

В отличие от процента агрессивных животных в линии, другой показатель агрессивного поведения—интенсивность (продолжитель-

ность) уже возникших драк не коррелирует с содержанием С1 рецепторов ни в коре мозга ($r_s = 0,3$, $p < 0,5$), ни в гиппокампе ($r_s = 0,3$, $p > 0,5$). Ранее было показано, что эти два параметра агрессивного поведения контролируются различными генетическими механизмами

Таблица

Величина $V_{\max}$ рецепторного связывания [3H]серотонина в коре мозга, и гиппокампе, процент агрессивных животных в линии и продолжительность драк у мышей инбредных линий

Линия	$V_{\max}$ специфического связывания [3H]серотонина (фмоль/мг белка) кора	гиппокамп	Процент агрессивных мышей	Продолжительность драк (с)
DD	48,1	95,4	16	20,6 $\pm$ 5,2
BA1 B/c	56,2	33,7	22	13,5 $\pm$ 2,0
C3H He	81,8	134,1	44	20,0 $\pm$ 2,8
AKR	82,8	164,9	51	15,9 $\pm$ 3,1
C57BL/6	107,2	143,3	55	30,7 $\pm$ 2,7

[7]; выявлена высокая положительная межлинейная корреляция между продолжительностью драк и активностью ключевого фермента биосинтеза серотонина в мозгу—триптофангидроксилазы [12].

Таким образом, рецепторы серотонина первого типа участвуют в реализации агрессивного поведения у мышей. Генетически детерминированная высокая концентрация С1 рецепторов в мозгу связана с наследственно обусловленной повышенной предрасположенностью животных к проявлению агрессивной реакции, но не с интенсивностью уже возникшего агрессивного поведения.

CORRELATION BETWEEN SEROTONIN, RECEPTOR CONCENTRATION IN BRAIN AND INTERMALE AGGRESSIVE BEHAVIOR OF MICE

MASLOVA G. B., KULIKOV A. V.

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

The genetic determined value of 3H -serotonin receptor binding in brain positive correlates with inherited predisposition of male mice to demonstration of intermale aggression, but does not correlate with intensity of aggressive behavior.

ЛИТЕРАТУРА

1. Peroutka S. J., Snyder S. H. *Mol. Pharmacol.*, v. 16, p. 687—699, 1979.
2. Peroutka S. J. *Ann. Rev. Neurosci.*, v. 11, p. 45—60, 1988.
3. Hoyer D. J. *Receptor Res.*, v. 8, p. 59—81, 1988.
4. Middlemiss D. N. *Trends in Pharmacol. Sci.*, v. 9, p. 83—84, 1988.
5. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение. Новосибирск, Наука, 1978.
6. Куликов А. В. *Изв. СО АН СССР*, вып. 3, с. 123—126, 1983.

7. *Porro N. K., Kulikov A. V. Aggressive Behavior*, v. 12, p. 425—432, 1986.
8. *Munson P. J., Rodbard D. Anal. Biochem.*, v. 107, p. 220—239, 1980.
9. *Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Варфоломеев С. Д.* — В кн.: *Современные проблемы биокинетики* (под ред. С. Д. Варфоломеева), с. 198—255, М., МГУ, 1987.
10. *Закс Л. Статистическое оценивание*. М., Статистика, 1976.
11. *Sawada M., Nagatsu T. J. Neurochem.*, v. 46, p. 963—967, 1986.
12. *Попова Н. К., Куликов А. В.* Журн. высшей нервн. деят-сти, т. 33, с. 589—591. 1983.

Поступила 12. X. 1990.

Protein Methods. D. M. Bollag, S. J. Edelstein, Wiley-Liss, USA—242 p., 1991.

Методы исследования белков.

При условии нарастающей стандартизации методологии работы с ДНК, приемы белкового анализа поддаются обобщению гораздо труднее из-за большего разнообразия в строении и свойствах этих макромолекул. Однако существование определенных основополагающих правил, управляющих поведением практически всех белков, позволяет использовать множество простых приемов, пригодных для обработки и анализа практически любой пробы белков.

«Методы исследования белков» являются универсальным современным руководством, описывающим общелабораторные методы анализа и определения белков. В нем приведены надежные стандартизированные лабораторные методы в доступном изложении, позволяющем даже начинающим работникам использовать разнообразные приемы. Для более подготовленного читателя в тексте приводится критическая оценка предлагаемых методов и основные ссылки на оригинальные источники, что предоставляет возможность для более углубленного изучения интересующих его вопросов. Там же приводится список необходимых приборов и реактивов и предупреждения относительно наиболее часто наблюдающихся ошибок.

Книга включает следующие главы: «Подготовка к выделению белков», «Экстрагирование белков», «Концентрирование белков», «Гель-ЭФ в денатурирующих условиях», «Гель-ЭФ в неденатурирующих условиях», «Изоэлектрофокусирование и двухмерный гель-ЭФ», «Иммуноблоттинг».

УДК 612.822.1:577.175.823:615.212.7:547.95

ВРЕМЕННАЯ ДИНАМИКА АМИНОПЕПТИДАЗНОЙ АКТИВНОСТИ—ПОКАЗАТЕЛЬ АДАПТАЦИОННЫХ ПРОЦЕССОВ В ЦНС

СЕРГУТИНА А. В., ГЕРШТЕЙН Л. М.

НИИ мозга АМН СССР, Москва

Нарушение интегративной деятельности мозга при хроническом введении L-ДОФА наблюдается как в эксперименте при моделировании гиперактивности дофаминовой системы [1, 2], так и в клинике при длительном лечении L-ДОФА, когда после отмены препарата у некоторых больных возникают так называемые дискинезии [3]. Нейрохимический механизм подобных нарушений во многом не ясен. Чтобы подойти к его раскрытию, у животных с исходно разной локомоторной изучали корреляцию между длительностью введения L-ДОФА и изменением морфохимических взаимоотношений сенсомоторной коры и подкорковых образований двигательной (хвостатое ядро) и мезолимбической (*n. accumbens*) систем мозга, активно реагирующих на изменение дофаминового обмена. С этой целью в указанных образованиях определяли активность аминопептидазы—фермента катаболизма белков.

Изучение влияния L-ДОФА проводили на крысах-самцах линии Wistar массой тела 250 г с высокой (ВДА) (число пересеченных квадратов 140—200) и низкой (НДА) (число пересеченных квадратов менее 80) двигательной активностью в «открытом поле» и различающихся уровнем обмена веществ в норме [4]. Гиперфункцию дофаминовой системы создавали с помощью фармакологического препарата мадопар-125. Животным обеих групп препарат на физиологическом растворе вводили в течение 3-х или 14 суток в суточной дозе 25,5 мг/кг массы, соответствующей действию 50 мг/кг массы чистой L-ДОФА. Контрольным животным вводили физиологический раствор.

После 3-х или 14-и суток введения L-ДОФА, а также через 14 суток после прекращения ее введения животных декапитировали под легким эфирным наркозом, извлекали мозг и замораживали его в криостате КРИО-КАТ (США). На срезах мозга, изготовленных в криостате (толщина 20 мкм), определяли активность аминопептидазы (АМП) на субстрате d,l-аланин-2-нафтиламид [5] в слоях III и V сенсомоторной коры, хвостатом ядре и *n. accumbens*. Количественную

оценку активности АМП проводили на микроскопе ЛЮАМ-ИЗ при длине волны 550 нм. Статистическую обработку результатов осуществляли по Стьюденту.

На рисунке видно, что при 3-суточном введении L-ДОФА у животных ВДА имеет место статистически достоверное возрастание активности АМП в хвостатом ядре и особенно в *n. accumbens* соответственно на 12 и 36%. В коре изменений не обнаружено. У этой же группы животных при введении L-ДОФА в течение 14 суток активность АМП имеет тенденцию к снижению лишь в хвостатом ядре (на 8%), тогда как в других исследованных образованиях она практически не отличается от контроля. После отмены L-ДОФА уровень АМП соответствует контролю во всех образованиях.

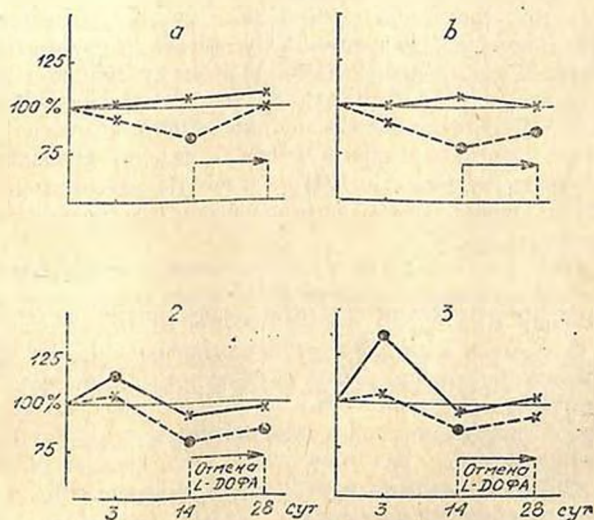


Рис. Изменение активности аминопептидазы в % по отношению к контрольному уровню (100%) в слоях III (а) и V (б) сенсомоторной коры (1), хвостатом ядре (2) и *n. accumbens* (3) мозга крыс под влиянием L-ДОФА; изменение активности аминопептидазы у животных ВДА (—) у животных НДА (---). 3 сутки и 14 суток—сроки введения мадопара-125, 28 суток—2 недели после отмены мадопара-125.

У животных НДА при 3-суточном введении L-ДОФА достоверных изменений по всем исследованным образованиям не выявлено. Вместе с тем при 14-суточном введении отмечается снижение активности АМП как в подкорковых образованиях—хвостатом ядре (на 22%) и *n. accumbens* (на 13%), так и в коре—в слое III—на 17% и слое V—на 18%. При отмене L-ДОФА у этих же животных изменения в хвостатом ядре (—14%) и слое V коры (—14%) сохраняются, а в слое III коры и *n. accumbens* активность АМП нормализуется.

Анализ полученных экспериментальных данных показал, что исследованные две группы животных характеризуются различной временной динамикой уровня активности АМП—одного из ферментов обмена белков, в определенной степени отражающего состояние катабolicеских процессов в мозгу.

Можно видеть, что у животных с ВДА наблюдаются уже через 3 суток достоверные изменения активности АМП в исследованных нами подкорковых образованиях мозга, особенно в *n. accumbens*—ключевой структуре в интеграции сенсомоторных функций лимбических и стриатных отделов мозга. На последующих сроках (14-суточное хроническое введение и отмена препарата) уровень активности АМП как в корковых, так и подкорковых структурах не отличается от такового у контрольных животных.

Вместе с тем, отсутствие изменений в уровне активности АМП при 3-суточном введении мадопара-125 у животных группы НДА при более длительном введении препарата (14 суток) вызывает достоверное снижение активности фермента во всех исследованных структурах, и, что особенно примечательно, выраженные изменения наблюдаются в коре. Отмена препарата (через 2 недели) приводит к нормализации уровня активности АМП в слое III сенсомоторной коры и *n. accumbens*. Однако достоверные изменения сохраняются в слое V коры и хвостатом ядре.

Ранее нами показано, что у исследованных групп животных в условиях рассматриваемого эксперимента проявляются различия и в ответной реакции со стороны ферментов обмена медиаторов—АХЭ и МАО [6]. Основываясь на литературных данных, можно предположить, что животные группы ВДА, которых относят к эмоционально реактивным [7, 8], обладают большей чувствительностью к действию L-ДОФА уже в начальные сроки введения препарата, однако в дальнейшем, по-видимому, у них отмечается компенсация в обменных процессах, что может явиться препятствием для развития дискинезий при хроническом введении препарата.

Таким образом, ответная реакция как на краткосрочное, так и длительное введение препарата имеет свои особенности, что, по нашему мнению, во многом определяется исходным типом поведения животных, в частности их двигательной активностью, которую связывают с эмоциональностью животных. Однако высказываемое нами предположение требует проведения физиологических экспериментов.

TIME-DEPENDENT CHANGES IN AMINOPEPTIDASE ACTIVITY AS A MARKER OF ADAPTIVE PROCESSES IN CNS

SEROUTINA A. V., GERSHTEIN I. M.

Brain Research Institute, Academy of Medical Sciences, Moscow

Under the conditions of dopamine system hyperfunction caused by short (3 days) or long (14 days) term Madopar-125 injection the CNS

aminopeptidase activity in animals differing in their motor activity in the "open field" is characterized by certain peculiarities. The probability of a correlation between the response to Madopar injection and its abolition and the differences in the animals initial behavior is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Авазашвили Н. М., Норданишвили Г. С., Николашвили М. М. Нейрохимия, т. 4, вып. 2, с. 141—147, 1985.
2. Подольский И. Я. Некоторые проблемы фармакологии поведения, Пушкино, 1984.
3. Lee T., Seston P., Rajput A. Nature, v. 273, N 5657, p. 59—61, London, 1978.
4. Герштейн Л. М., Камышева А. С., Чеботарева Т. Л., Сергутина А. В., Орлова Е. И. Журн. выш. нерв. деят.-сти, т. 41, № 2, с. 300—305, 1991.
5. Герштейн Л. М. Цитология, т. 7, № 6, с. 769—773, 1965.
6. Герштейн Л. М., Сергутина А. В. — В кн.: Физиология и биохимия медиаторных процессов. Тезисы докладов V Всесоюзн. конф., с. 72, М., 1990.
7. Белова Т. И., Добракова М., Иванова Т. М., Опришлова З., Кветанский Р. Физиол. журн. СССР, т. 71, № 7, с. 813—821, 1985.
8. Whimley A. E., Denenberg V. H. J. Comp. Physiol., Psychol., v. 63, N 4, p. 500—504, 1967.

Поступила 21. I. 1991

The Use of ¹²⁵I-PLC in Receptor Biochemistry (ed. A. P. Kerlavage), J. Wiley and Sons, Baffin Lane, Chichester, 268 p., 1990.

Использование ВЭЖХ в биохимии рецепторов

В книге рассматривается методология ВЭЖХ и приводятся примеры наиболее важных успехов в очистке рецепторов, достигнутых благодаря использованию техники хроматографии. Приводятся также разнообразные примеры лабораторного применения ВЭЖХ для решения отдельных биохимических задач, в том числе наиболее эффективное использование особо чувствительной техники, капиллярных колонок для синтеза, очистки и характеристики синтетических пептидов. Сборник является очередным, 14-ым томом в продолжающемся издании «Биохимия и методология рецепторов».

aminopeptidase activity in animals differing in their motor activity in the „open field“ is characterized by certain peculiarities. The probability of a correlation between the response to Madopar injection and its abolition and the differences in the animals initial behavior is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Авазашвили Н. М., Норданишвили Г. С., Николашвили М. М. Нейрохимия, т. 4, вып. 2, с. 141—147, 1985.
2. Подольский И. Я. Некоторые проблемы фармакологии поведения, Пушкино, 1984.
3. Lee T., Seston P., Rajput A. Nature, v. 273, N 5657, p. 59—61, London, 1978.
4. Герштейн Л. М., Камышева А. С., Чеботарева Т. Л., Сергутина А. В., Орлова Е. И. Журн. выш. нерв. деят.-сти, т. 41, № 2, с. 300—305, 1991.
5. Герштейн Л. М. Цитология, т. 7, № 6, с. 769—773, 1965.
6. Герштейн Л. М., Сергутина А. В. — В кн.: Физиология и биохимия медиаторных процессов. Тезисы докладов V Всесоюзн. конф., с. 72, М., 1990.
7. Белова Т. И., Добракова М., Иванова Т. М., Оприалова З., Кветанский Р. Физиол. журн. СССР, т. 71, № 7, с. 813—821, 1985.
8. Whimley A. E., Denenberg V. H. J. Comp. Physiol., Psychol., v. 63, N 4, p. 500—504, 1967.

Поступила 21. I. 1991

The Use of ¹²⁵I-PLC in Receptor Biochemistry (ed. A. P. Kerlavage), J. Wiley and Sons, Baffin Lane, Chichester, 268 p., 1990.

Использование ВЭЖХ в биохимии рецепторов

В книге рассматривается методология ВЭЖХ и приводятся примеры наиболее важных успехов в очистке рецепторов, достигнутых благодаря использованию техники хроматографии. Приводятся также разнообразные примеры лабораторного применения ВЭЖХ для решения отдельных биохимических задач, в том числе наиболее эффективное использование особо чувствительной техники, капиллярных колонок для синтеза, очистки и характеристики синтетических пептидов. Сборник является очередным, 14-ым томом в продолжающемся издании «Биохимия и методология рецепторов».

УДК 577.12:612.15:612.82

СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ НЕЙРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ БЕЛКОВ В КРОВИ БОЛЬНЫХ С ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ

*БЕРЕЖНОЙ Г. А., ЛИСЯНЫЙ Н. Н., *БЕЛИК Я. В., ЧЕРЕНЬКО Т. М.,
*ЛЫХМУС Е. Ю., *КОМИССАРЕНКО С. В., ТУХТАЕВ Н. Х., АРУСТАМЯН Р. С.

НИИ нейрохирургии АМН УССР

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

Выявление в крови у больных с различной патологией нервной системы противомозговых антител послужило толчком к выяснению антигенной направленности этих аутоантител. Наиболее часто, как показывает анализ спектра противомозговых антител в индукции аутоиммунных реакций участвуют специфические для нервной ткани белки: S-100, ОБМ—основной белок миелина, нейроспецифическая енолаза или белок 14-3-2, глальный фибриллярный кислый белок и некоторые другие. Определение этих и прочих нейроспецифических белков (НСБ) в биологических жидкостях у больных с помощью высокочувствительных радиоиммунного и иммуноферментного методов при некоторых видах иммунопатологических заболеваний нервной системы позволяет делать некоторые диагностические и прогностические выводы [1—5].

В то же время практически не изучены особенности циркуляции НСБ в крови больных с травматическими поражениями головного мозга [6, 7]. В этой связи в наших исследованиях было изучено содержание маркера олигодендроглии и миелина—ОБМ и нейроспецифического белка 14-3-2 в сыворотке крови больных в ранние сроки после легкой и тяжелой закрытой черепно-мозговой травмы (ЧМТ).

Исследовано содержание нейроспецифических белков ОБМ и 14-3-2 в сыворотке крови 87 больных с закрытой ЧМТ и 21 донора. Определение нейроантисывов проводили методом непрямого неконкурентного иммуноферментного анализа (ИФА) [8]. Принцип метода заключался в двухэтапной постановке реакции: на первом этапе взаимодействовали антиген и антитела в жидкой среде, а затем прореагировавшая смесь вступала во взаимодействие с антигеном, сорбированным на планшете с последующим тестированием вторичными противовидовыми антителами, мечеными пероксидазой хрена.

ОБМ и белок 14-3-2 выделяли из бычьего головного мозга [9, 10]. Получение антисывороток к ОБМ и 14-3-2 описано ранее [10, 11].

Для тестирования конечных этапов определения НСБ методом ИФА использовали конъюгат антивидовых кроличьих иммуноглобулинов с пероксидазой («Amersham», Англия; Институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. Н. Ф. Гамален), а также биотин-стрептавидиновую систему («Amersham», Англия). НСБ сорбировали в течение 18 ч при 3° на планшетах (Dynatech) в концентрации 5 мкг/мл. Для сорбции ОБМ использовали 0,1 М фосфатно-цитратный буфер pH 6,5, для белка 14-3-2—0,1 М карбонатно-бикарбонатный буфер pH 9,6. Не связавшиеся места на лунках заполняли 1%-ным раствором БСА в 0,01 М фосфатно-солевом буфере pH 7,4 в течение 20 мин при комнатной температуре. Параллельно на втором планшете смешивали исследуемые сыворотки больных или доноров с антисывороткой к соответствующему нейроантигену в разведении, установленном предварительными исследованиями (1:6400 для 14-3-2 и 1:6000 для ОБМ). Исследуемую сыворотку и стандартную тест-систему антигена использовали в трех дублях. Пробы инкубировали в течение 3 ч при комнатной температуре. Впоследствии прореагировавшую смесь исследуемых сыворотки и антисыворотки наносили на планшеты с сорбированными НСБ. После двухчасовой инкубации при 37° планшеты промывали и добавляли конъюгат антивидовых антител с пероксидазой. Инкубация продолжалась 1 ч при 37°. В качестве субстрата использовали 0,08%-ный раствор 5-аминосалициловой кислоты с добавлением 0,005%-ной перекиси водорода. Планшеты фотометрировали на приборе КАИ-Ц-01.

Использование в качестве варианта индикации биотин-стрептавидиновой системы заключалось: а) в добавлении противовидовых биотинилированных антител в разведении, выбранном предварительными исследованиями (1:1000) с последующей инкубацией при 37°; б) в нанесении стрептавидин-биотинилированного ферментного комплекса в разведении 1:1500 и 30 мин, инкубации при 37°.

В качестве субстрата использовали АВТ (0,55 мг 2,2-азинодиэтил-бензиалозолинесульфоновой кислоты) в фосфатно-цитратном буфере pH 4,3 с содержанием 0,002%-ной перекиси водорода. Останавливали реакцию 0,1 н раствором лимонной кислоты с 0,01%-ным азидом натрия. Спектрофотометрировали при длине волны 410 нм.

Определение содержания НСБ, в частности белка 14-3-2, в сыворотке крови здоровых лиц показало, что у 13 из 21 донора (у 62%) концентрация белка находилась за пределами чувствительности ИФА, основанного на применении меченых пероксидазой антител и составляла менее 2 нг/мл. Применение биотин-стрептавидиновой системы позволило добиться повышения чувствительности метода и определить меньшее количество нейронального антигена, вплоть до 0,4 нг/мл. Используя эту модификацию ИФА стало возможным выявить белок 14-3-2 у 21 донора в концентрации $1,67 \pm 0,43$ нг/мл (таблица). При этом средние концентрации, превышающие указанные цифры, считали повышенными и обнаруживали с определенной частотой при гравме мозга различной степени. Так, число отклонений от нормы в содер-

жании белка 14-3-2 у больных с сотрясением мозга и ушибом легкой степени составляло 26—41%. Существенно, до 87—88%, увеличивалась частота повышения концентраций нейронального антигена при тяжелой травме—ушибах мозга средней и тяжелой степени.

Средние значения концентраций белка 14-3-2, определяемого в крови в 1—2-е сутки после травмы, колебались в пределах от 2,5 до 10,2 нг/мл и находились в определенной зависимости от тяжести ЧМТ. При этом значительное увеличение содержания антигена по сравнению с донорским уровнем найдено нами при тяжелой травме мозга. Продолжали возрастать концентрации нейроспецифического антигена в более поздние сроки после ЧМТ—на 5—6 сутки и достигали в среднем 16 нг/мл.

Таблица

Содержание белка 14-3-2 и основного белка миелина (ОБМ) в крови у больных с ЧМТ различной тяжести (в нг/мл)

Тяжесть травмы	Срок после травмы			
	белок 14-3-2		ОБМ	
	1—2 сутки	5—6 сутки	1—2 сутки	5—6 сутки
Сотрясение мозга	2,51±0,71 n=19	3,65±0,99 n=19	16,43±3,97 n=19	18,9*±4,23 n=19
Ушиб легкой степени	4,09±1,13 n=17	5,91**±1,24 n=17	21,23*±5,67 n=17	24,42*±6,38 n=17
Ушиб средней степени	9,57***±1,76 n=16	14,52**±4,14 n=16	42,15**±9,74 n=16	35,41*±10,14 n=16
Ушиб тяжелой степени	10,20***±2,5 n=17	16,53***±4,31 n=17	47,64**±10,55 n=17	37,22**±10,20 n=17
Контрольная группа (доноры)	1,67±0,43 n=21		8,63±2,30 n=21	

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ —достоверность различий изучаемых показателей с показателями у доноров.

По данным единичных публикаций [5], концентрация белка 14-3-2 при кровоизлияниях в мозг травматической природы составляет 364 нг/мл.

Исследования содержания другого специфического для нервной ткани белка—маркера олигодендроглина и миелина не только обнаруживало его повышение в сыворотке крови (по сравнению с донорскими значениями $8,6 \pm 2,3$ нг/мл), но и выявило определенную зависимость между увеличением концентрации ОБМ и степенью деструкции нервной ткани (таблица). В ранние сроки после ЧМТ (1—2 сутки) средние значения концентраций ОБМ находились в пределах от 16,4 до 47,6 нг/мл, причем у некоторых пострадавших выявлялось до 200 нг/мл белка, что свидетельствовало о значительном деструктивном процессе в головном мозгу и проникновении большого количества этого антигена в кровь. По содержанию ОБМ от здоровых существенно отличались не только больные с тяжелыми повреждениями мозга, но и с легким ушибом. Следует отметить, что увеличение содержания ОБМ в сыворотке крови травмированных выявлялось не во

всех случаях. Так, при легкой ЧМТ повышение концентраций антигена в 1—2 сутки после нее обнаруживалось в крови только в 36—58% случаев, при тяжелых повреждениях—в 76—81%.

При исследовании крови пострадавших после ЧМТ на 5—6 сутки после травмы установлено, что концентрации ОБМ имеют тенденцию к возрастанию при легкой травме, а при тяжелых ушибах мозга уже на 1—2 сутки отмечается высокое содержание ОБМ, которое в дальнейшем снижается. Наиболее простым объяснением такой диспропорции может быть медленное нарастание деструктивно-воспалительной иммунопатологической реакции при незначительном легком повреждении головного мозга и быстрое ее развитие при тяжелой травме головного мозга.

Таким образом, обнаружение малых количеств НСБ в сыворотке крови доноров, что стало возможным благодаря бнотин-стрептавидиновой модификации ИФА, свидетельствует, с одной стороны, о неполной иммунологической изолированности головного мозга и его аутоантигенов, с другой стороны—о возможном существовании активно-супрессорной формы иммунологической толерантности к этим антигенам в норме. Исследование содержания различных НСБ в ликворе и крови больных с ЧМТ позволяет определять не только тяжесть травмы, но и дифференцировать вовлечение в патологический процесс нейроглии или нейронов, что представляется важным для понимания патогенеза и исходов этого вида патологии.

THE LEVEL OF SOME NEUROSPECIFIC PROTEINS IN BLOOD OF PATIENTS AFTER CEREBRAL TRAUMA

BEREZHNOL G. A., LISYANYI N. I., BELIK Ya. V., CHEREN'KO T. M.,
LYKHIMUS N. Ya., KOMISSARENKO S. V., TUKHTAEV N. Kh.,
ARUSTAMYAN R. S.

Institute of Neurosurgery, USSR Academy of Medical Sciences, Kiev
Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Ukrainian SSR, Kiev

The level of neurospecific proteins has been studied in peripheral blood of donors and patients with cerebral trauma using immunoenzyme analysis (ELISA). It has been demonstrated that the use of non-direct competitive ELISA allows the detection of neurospecific autoantigens in blood. Specifically these antigens include myelin basic protein and protein 14-3-2. After cerebral trauma the level of neurospecific proteins, specifically of protein 14-3-2, in circulating blood depends on the severity of trauma and the time of investigation.

Myelin basic protein appears after mild as well as after severe trauma, whereas protein 14-3-2, a marker of neurons, is detected predominantly after severe trauma. This points out to a different extent of damage of neuroglia and neurons after trauma of different severity. The neurospecific proteins appear in blood immediately after trauma and their level in circulation increases at days 3—5 post-trauma.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Michetti F., Massaro A., Russo G., Rigon G. J. Neurol. Sci., № 41, p. 259—263, 1980.
2. Mokuno K. J. Neurol. Sci., № 60, p. 443—451, 1983.
3. Noppe M. Clin. chim. Acta, v. 155, № 2, p. 143—150, 1986.
4. Palfreyman J. W., Johnston R. V., Ratcliffe J. G. et al. Clin. chim. acta, v. 148, № 3, p. 403—409, 1979.
5. Voller A., Bidwell D. E., Barthe N. A. Bull. world Health organ, № 53, p. 55—65, 1976.
6. Graham D. I., Thomas D. G. T., Brown I. Histopathology, № 7, p. 1—21, 1983.
7. Thomas D. G. T., Palfreyman C. W., Ratcliffe J. G. Lancet, v. 1, p. 113—116, 1978.
8. Zeltner P. M., Schneider S. L., Marangos P. J., Zvelg M. N. J. Natl. Cancer Invest., v. 77, № 3, p. 625—631, 1986.
9. Autilio L. A., Norton W. T., Ferry R. D. J. Neurochem., v. 11, № 1, p. 17—27, 1964.
10. Бережной Г. А. Укр. биохим. журн., т. 56, № 2, с. 123—126, 1984.
11. Лисяный Н. Н., Черенько Т. М., Терлецкая Я. Т. Врачеб. дело, № 10, с. 310—311, 1987.

Поступила 4. VII 1990

N. B. Wery GABA_n. J. Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester. 350 p., 1990.

ГАМК_B

В историческом аспекте рассматриваются и обобщаются данные литературы о рецепторах ГАМК_B охватывающие фармакологические, биохимические и электрофизиологические аспекты, сведения о возникновении вторичных мессенджеров и их роли в нейротрансмиссии и нейромодуляции.

В книге изложены новейшие сведения о рецепторах ГАМК_B. Так, в ней впервые содержатся данные об антагонистах рецепторов ГАМК_B, проникающих через ГЭБ, благодаря которым можно найти пути для оценки потенциала этих рецепторов как мишеней для препаратов, используемых при лечении эпилепсии, депрессии, расстройствах памяти и болеутоления.

УДК 547.258.11:612.82]615.9

ОБОЗРЫ

ОСНОВНЫЕ ПРОЯВЛЕНИЯ И МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ ОЛОВООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

РОЗАНОВ В. А., ШАФРАН Л. М.

Всесоюзный НИИ гигиены водного транспорта МЗ СССР, Одесса

На примере группы оловоорганических соединений (ООС) представлены основные проявления и возможные механизмы нейротоксического действия. Продемонстрирован широкий спектр эффектов ООС на состоянии основных жизненно важных процессов мозга (энергетический метаболизм, состояние биомембран и миелина, синтез и функции нейроспецифических белков, синаптические процессы).

Анализ основных нейроморфологических проявлений токсичности (избирательная нейрональная гибель в гиппокампе) в сочетании с другими признаками (снижение содержания и транспорта ГАМК, нейрофизиологические признаки нейрональной гиперактивности) дает основание полагать, что одним из существенных компонентов повреждающего действия ООС на нервную ткань является нарушение процессов центрального торможения.

Представлена обобщающая схема основных проявлений и механизмов реализации нейротоксического действия, определяющая стратегию изучения нейротоксичности в эксперименте.

Проблема нейротоксичности в настоящее время имеет в основном два аспекта. С одной стороны, это поиск нейротоксинов со специфическим узконаправленным действием и их использование в качестве инструмента нейробиохимических исследований [1—3], с другой стороны—это выявление нейротоксического действия у многочисленных промышленных токсикантов, пестицидов, компонентов полимерных материалов и других химических загрязнителей внешней среды, общее число которых постоянно растет [4]. Согласно экспертным оценкам, прямым или опосредованным нейротоксическим действием обладают до 28% известных химических загрязнителей [5], при этом вполне вероятно, что нейротоксические свойства многих веществ остаются невыявленными. В литературе имеются сведения о множественности эффектов различных токсикантов по отношению к нервной ткани, что отражает, с одной стороны, разнообразие механизмов их действия, а с другой—попытки найти новые чувствительные тесты на нейротоксичность. В результате работы международной группы специалистов под эгидой ВОЗ, Международной организации труда и Экологической Программы ООН был создан основополагающий документ [6], регламентирующий основные прин-

ципы и методы оценки нейротоксичности, что, в свою очередь, отражает уровень недавних представлений об основных проявлениях и механизмах нейротоксического действия. В то же время, в связи с быстрым развитием нейрохимии уже в последние годы наметился сдвиг в область изменений на молекулярном уровне как первоосновы последующих проявлений нейротоксического эффекта. Эту тенденцию можно проследить на примере группы оловоорганических соединений (ООС), интенсивно изучаемых в последнее время. Интерес к ООС обусловлен несколькими причинами, и прежде всего тем, что эти вещества проявляют отчетливое нейротоксическое действие по множеству тестов, что дает возможность на их примере рассмотреть многообразие проявлений нейротоксичности и их механизмы. Следует подчеркнуть, что, несмотря на то, что общая токсикология ООС нашла отражение в ряде обзорных статей [7—9] и справочных руководствах [10, 11], вопрос о нейрохимических механизмах их токсичности в отечественной литературе специально не обобщался. Имеющиеся в мировой литературе обзоры касаются только отдельных аспектов нейротоксичности ООС [12—14]. В то же время, в нашей стране вещества этого класса нашли широкое распространение в составе пластмасс, в качестве стабилизаторов масел и каучуков, а также компонентов необрастающих красок для судостроения и используются в гигиеническом регламентировании с учетом нейротоксических эффектов. Эти соображения послужили толчком для подготовки настоящего обзора.

Общая токсикологическая характеристика и клинические проявления интоксикации ООС. Согласно имеющимся экспериментальным данным, по мере увеличения молекулярной массы органических радикалов острая токсичность ООС снижается [7—9]. Тетра- и триалкильные производные более токсичны, чем ди- и моноалкильные [7, 11]. Выраженная нейротоксичность характерна в основном для низших трехзамещенных гомологов (триметил- и триэтилолово) [11, 15], которым посвящена основная масса исследований нейротоксикологического характера. Острая интоксикация триметилоловом у животных сопровождается снижением массы тела, судорогами, впоследствии нарастающей мышечной слабостью, тремором всего тела, вокализацией и повышенной агрессивностью, а также многообразными поведенческими нарушениями, выявляемыми с помощью специальных тестов [7, 18, 17]. Большинство ООС относятся к веществам 1—2 класса опасности, согласно принятой в СССР классификации [16].

Нейроповеденческие проявления интоксикации ООС. Нарушения поведения и когнитивной сферы являются чувствительным показателем нейротоксичности [17]. Применительно к триалкилзамещенным производным олова эти нарушения подробно описаны в обзоре [14]. Вкратце основные проявления нейроповеденческой токсичности ООС сводятся к следующему. Триметилолово в дозах $55\text{--}35 \cdot 10^{-6}$ моль/кг, что составляет 0,13—0,70 от LD_{50} при внутрижелудочном введении вызывает у крыс и макак проявления гиперактивности [19, 20] и в

то же время у животных наблюдаются отчетливые и длительные (до 40 суток) нарушения способности к научению (условно-рефлекторная реакция с пищевым подкреплением) [21] и оперантного поведения [19, 20]. Нарушения выработанного поведения при действии триметилолова наблюдались как у млекопитающих, так и в опытах на птицах, причем при меньших пороговых дозах [22]. Ряд данных, касающихся повышенного потребления алкоголя в условиях свободного выбора под влиянием триметилолова [23], нарушения отрицательного условного рефлекса на подслащенную воду [24] и безусловного рефлекса на воздушную струю [25] свидетельствуют о возможных нарушениях сенсорных функций и эмоциональной сферы.

Триэтилолово проявляет схожее нейротоксическое действие. Так, после однократной инъекции новорожденным крысам триэтилолова в дозе $6,2 \cdot 10^{-6}$ и $12,4 \cdot 10^{-6}$ моль/кг (что составляет соответственно 1/40 и 1/20 от LD_{50} при подкожном введении и не влияет на прирост массы тела в постнатальном периоде) у животных выявлены повышение спонтанной двигательной активности, снижение реакции испуга на воздушную струю и звуковой сигнал, увеличение латентного периода реакции пассивного избегания на болевое раздражение [26]. При больших дозах (1/10 от LD_{50}) токсиканта проявлялись изменения мышечного тонуса, паралич задних конечностей, тремор, нарушение координации движений, снижение спонтанной двигательной активности и нарушение функции сенсорных систем [14, 27, 28]. В дозах, составляющих 0,25–0,75 от LD_{50} при подкожном введении триэтилолово в течение месяца снижало болевую чувствительность у крыс [25].

Подводя итоги изучению нейроповеденческих проявлений токсичности ООС, следует подчеркнуть, что в основном они относятся к низшим гомологам—триметил- и триэтилолова. Лишь в последнее время появились данные о нейроповеденческих сдвигах, вызванных бис(три-и-бутилолово)оксидом [29]. Характер нейроповеденческих нарушений свидетельствует о нарушении сенсорных функций, эмоциональной сферы, способности к научению, нарушении кратковременной памяти и консолидации следа памяти и грубых изменений двигательной функции и координации движений.

Нейрофизиологические проявления токсичности ООС. Результаты нейрофизиологических исследований в основном согласуются с приведенными выше данными. Так, в одной из наиболее обстоятельных работ [30] было показано, что при регистрации электроэнцефалограммы у кроликов с помощью униполярных вживленных в кору электродов и интоксикации дихлордибутилоловом ($0,33 \cdot 10^{-3}$ моль/кг или 0,57 от LD_{50} , внутрижелудочно) выявляется стойкое диффузное возбуждение корковых структур (сдвиг в область быстрых колебаний, снижение амплитуды, десинхронизация). Триэтилолово в значительно меньшей дозе ($0,01 \cdot 10^{-3}$ — $0,04 \cdot 10^{-3}$ моль/кг, внутрибрюшинно) через 12 и 24 ч после введения вызывало у крыс в коре медленно-волновую активность, которая на 2-е сутки сменялась резко выражен-

ной патологической картиной с увеличением числа дельта волн, появлением спайков и изoeлектрических участков различной длительности [31]. Авторы подчеркивают сходство полученной кортикографической картины с изменениями, сопровождающими нарушение мозгового кровообращения и отек мозга. В условиях *in vitro* на срезах гиппокампа крыс показано, что аппликация триметилолова приводит к деполяризации гранулярных клеток и нарушениям их взаимодействия с другими клетками [32]. Авторы считают, что триметилолов вызывает нарушение механизмов центрального торможения [32].

В целом, приведенные данные свидетельствуют, что одним из механизмов токсического действия ООС является перевозбуждение нервных клеток, приводящее к их последующему повреждению.

Нейроморфологические проявления токсичности ООС. Основными проявлениями нейротоксичности ООС являются дистрофические изменения нейронов и более грубые изменения, вплоть до гибели нервных клеток, причем преимущественно в структурах лимбической коры [20, 33—35]. Известно, что нейроны лимбической коры, особенно пирамидные клетки полей СА₁ и СА₂ гиппокампа относятся к разряду легко повреждающихся при гипоксических и ишемических состояниях [36, 37]. В качестве основных причин такой селективной чувствительности к нехватке О₂ и субстратов окисления рассматривается склонность этих нейронов к гиперактивности из-за сильного возбуждающего влияния кислых аминокислот (глутамата и аспартата) и входящего тока Са²⁺ [36—38]. В ряде работ подчеркивается, что нейрональная гибель в полях СА₁ и СА₂ гиппокампа под влиянием ООС непосредственно связана с их влиянием на возбудимость этих нейронов [20, 33, 34, 39]. Отмечено, что введение кортиостерона перед интоксикацией триметилоловом защищает нейроны гиппокампа от гибели, что связывают со снижением их возбудимости под влиянием стероидов [39]. Имеются данные, из которых следует, что одной из причин гибели пирамидных клеток может быть нарушение нейрокоммуникативных процессов, в частности, между ними и зернистыми клетками [40].

В целом эти факты дают основание полагать, что одним из компонентов повреждающего действия ООС является срыв механизмов торможения и перевозбуждение с последующим повреждением наиболее чувствительных нейронов гиппокампа по гипоксическому механизму. Учитывая известную роль гиппокампа в формировании следа памяти, можно прийти к выводу, что эти сведения хорошо согласуются с приведенными выше данными о нарушении процесса обучения животных при интоксикации ООС.

Следует, однако, отметить, что повреждения нейронов являются лишь одним из морфологических проявлений токсичности ООС. Их действие проявляется не только нарушениями в сером, но и в белом веществе мозга. Так, при внутривенном введении триэтилолова уже через несколько часов после инъекции отмечается отек белого вещества и вакуолизация миелина [41], а при инкубации срезов

n. opticus в присутствии триэтилолова нарушается дифракционный рисунок миелина [42]. В целом ряде работ отмечено, что триэтилово вызывает выраженный отек мозга с увеличением общего содержания воды [43] и ее отложением между слоями миелина [44, 45]. Выраженные явления отека белого вещества при интоксикации низшими гомологами трехзамещенных ООС дают основание рассценивать эти вещества как средства для моделирования дегенеративных расстройств ЦНС [14]. Следует подчеркнуть, что нейроморфологические нарушения возникают в том же диапазоне доз ООС, что и нейроповеденческие сдвиги, хотя по времени возникновения они заметно запаздывают [14].

Таким образом, основными морфологическими проявлениями нейротоксичности ООС являются избирательное повреждение пирамидных нейронов лимбической коры и нарушения структуры миелина, сопровождающиеся отеком белого вещества.

Нейрохимические механизмы токсичности ООС. Анализ литературы показывает, что проявления токсического действия ООС на нервную ткань на нейрохимическом уровне могут быть в принципе разделены на три группы: нейрометаболические сдвиги, отражающие фундаментальные метаболические процессы применительно к нервной ткани; изменения состояния и обмена нейроспецифических белков и липидов и собственно нейрохимические изменения, отражающие состояние медиаторных систем мозга и синаптических процессов.

Уже в первых работах по изучению биологического действия ООС было показано угнетение ими реакций цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования, торможение поглощения O_2 срезами коры головного мозга [47]. В экспериментах *in vitro* триэтилово в концентрации 10^{-5} М ингибирует дыхание митохондрий на 60% [46], угнетает окисление глутамата, в меньшей степени сукцината, а при больших концентрациях — пирувата [46, 47]. В аналогичных экспериментах подтверждено, что ООС самой различной химической структуры являются ингибиторами дыхания митохондрий, причем у большинства исследованных соединений IC_{50} лежит в пределах $0,9—2,5 \cdot 10^{-6}$ М [48]. Эти факты рассматриваются как проявление мембранотропного повреждающего действия гидрофобных ООС, что находит подтверждение при анализе состояния и других мембранопосвященных ферментных систем мозга, в частности АТА-аз [49]. В последнем случае эффективные концентрации для гомогенатов нервной ткани составляют $60—240 \cdot 10^{-6}$ М. Таким образом, ООС повреждают мембранопосвященные ферментные системы, и, прежде всего, ферменты биоэнергетики, вызывая состояние, близкое к тканевой гипоксии. В связи с этим, представляет интерес работа, в которой внутривенное введение триметилолова ($14 \cdot 10^{-6}$ моль/кг) сопровождалось помещением животных в среду, обедненную (10%) или обогащенную (40% и 100%) кислородом [50]. Выяснилось, что пребывание в среде с повышенным парциальным давлением O_2 усиливает влияние триметилолова, в частности на надпочечники, что можно

рассматривать как суммацию мембранотоксического эффекта триметилолова и O_2 .

Мембранотропное действие триметилолова ($5 \cdot 10^{-6}$ моль/кг внутривенно, ежедневно, в течение 8 дней) проявляется также в резком усилении перекисного окисления липидов мембран, общем снижении их содержания, повышении липазной активности, изменении процентного содержания холестерина и ганглиозидов, преимущественно в мозжечке и стволе мозга [51]. Особое внимание следует обратить на уменьшение содержания ганглиозидов, что может иметь существенное значение в развитии неврологических нарушений. Так, спустя 8,5 месяцев после перорального введения животным триметилолова в дозе $30 \cdot 10^{-6}$ моль/кг (0,6 от LD_{50}) в экстрактах переднего мозга, ствола, мозжечка и миндаля общее содержание холестерина и фосфолипидов было нормальным, в то время как в составе ганглиозидов, особенно в переднем мозгу, отмечено увеличение содержания GD1b и GM1. В стволе мозга снижалось содержание GT1b и увеличивалось содержание GD1b [52].

Нарушение нативной структуры биомембран неминуемо влечет за собой дезорганизацию многих тонких механизмов передачи биологического сигнала, модулируемого мембраносвязанными ферментными системами. В частности, показано, что интоксикация триэтилоловом ($41 \cdot 10^{-6}$ моль/кг массы внутривенно) приводит к угнетению функции ФДЭ, гидролизующей 3,5-сАМР, во фракции частиц и цитозоля гомогенатов головного мозга крыс [53].

К числу наиболее чувствительных нейрохимических показателей токсичности ООС может быть отнесено состояние нейроспецифических белков. Наиболее отчетливо эти изменения выявляются в раннем постнатальном периоде, когда в процессе созревания мозга идет интенсивный биосинтез этих белков. Так, введение крысам на 5-й день постнатального периода триметилолова ($25-30 \cdot 10^{-6}$ моль/кг массы тела, внутривенно) через 1, 2 и 6 недель приводило к снижению содержания синапсина I в гиппокампе [54]. У половозрелых животных при введении триметилолова ($18-45 \cdot 10^{-6}$ моль/кг, внутривенно) содержание синапсина I в нервной ткани также снижалось, при этом наблюдалось торможение эндогенного и стимулированного сАМР-зависимого фосфорилирования этого нейроспецифического белка в гиппокампе [55]. Эти изменения сохранялись в течение 2—3 месяцев, после однократной инъекции триметилолова и сопровождалась общим снижением содержания белка и гибелью пирамидных нейронов гиппокампа, в то же время наблюдалась пролиферация глиальных клеток и 3—5-кратное увеличение содержания астроцитарного глиального фибриллярного белка [56]. Эти данные подтверждены в работе Вега и соавт. [52], в которой также отмечено снижение содержания мест связывания кортикостероидов в гиппокампе. Можно предполагать, что ускоренное размножение глиоцитов и признаки их метаболической активности отражают реакцию на нейрональную гибель в гиппокампе при интоксикации ООС.

В последующих работах было показано, что не только классический нейротоксический агент триметилолово, но и другие ООС, в частности трибутилолово и бис(три-и-бутилолово)оксид, при поступлении в организм, особенно в раннем постнатальном периоде, вызывают нарушения синтеза целого ряда нейронспецифических и глиаспецифических белков—белка р38, нейрофиламента 200, основного белка миелина и глиального фибриллярного кислого белка [57, 58]. Наиболее выраженными были сдвиги в содержании белка р38 и основного белка миелина в мозжечке; снижение содержания белков возникало при дозах вводимых веществ, которые не влияли на массу мозга, и исчезали по мере взросления животных [57].

Наблюдаемые сдвиги в биосинтезе и содержании нейроспецифических белков, особенно синапсина I, свидетельствуют о нарушении синаптических процессов при действии ООС. В ряде работ на основании косвенных данных высказываются предположения о преимущественном нарушении механизмов торможения в ЦНС при действии ООС [29, 32]. Многократное введение новорожденным крысам триметил- и триэтилолово ($5.5 \cdot 10^{-6}$ и $1 \cdot 10^{-6}$ моль/кг соответственно, ежедневно в течение 27 дней, внутривентриально) приводит к исходу 2-месячного постнатального периода к снижению концентрации ГАМК в гиппокампе при сохранении концентрации АХ, холина, диоксифенилацетата, гомованилиновой кислоты и норадреналина [59]. Таким образом, возможно, дефицит обусловленного ГАМК торможения действительно играет определенную роль в развитии неконтролируемого перевозбуждения и последующего повреждения пирамидных нейронов гиппокампа. Однако, вероятнее всего, это связано со спецификой нейронных систем гиппокампа, поскольку нарушение медиаторных систем при действии ООС не носит специфического узконаправленного на отдельные структуры мозга характера. Так, триметилолово *in vivo* и *in vitro* тормозит поглощение фракцией грубых синапсом из мозга крысы как ГАМК, так и других нейромедиаторов [60]. Разнообразные проявления нейроповеденческой токсичности и глубокие метаболические сдвиги в ЦНС при действии ООС свидетельствуют об их взаимодействии со многими медиаторными системами—ГАМК-ергической, норадренергической, дофаминергической, серотонинергической [14]. Кроме того, различные токсические эффекты ООС могут реализовываться по различным механизмам. Так, прямое нейротоксическое действие на наиболее чувствительные к повреждению клетки гиппокампа, вероятнее всего, связано с дефицитом торможения, обусловленного ГАМК, в то время как угнетение обратного захвата ГАМК в нейроструктурах может лежать в основе антиконвульсивного действия ООС в силу замедленной инактивации медиатора и нарастающего торможения определенных групп нейронов [60, 61]. Эти соображения подтверждаются тем, что антиконвульсивное действие триметилолово усиливается при одновременном введении ингибиторов обратного захвата и метаболизма ГАМК—глутаматовой кислоты и γ -винил-ГАМК [61], и ослабляется под действием бикикуллина, но

не налоксона [60]. Представляет интерес тот факт, что характер, локализация и, по-видимому, механизм формирования патологических очагов в гиппокампе и других структурах лимбической коры при интоксикации триметилоловом и введении конформационно жесткого аналога глутамата канниовой кислоты различен [62]. Это обстоятельство, а также тот факт, что барбитураты подавляют судорожные очаги, индуцированные ООС [62], а триэтилолово блокирует судороги, вызванные введением антагонистов ГАМК-рецепторов [63], косвенно свидетельствуют о срыве процессов торможения как о начальном звене патологического процесса, за которым следует, по-видимому, избыточная активация системы возбуждающих аминокислот.

Ряд данных свидетельствует о вовлечении в процесс повреждения, связанный с действием ООС, холинергической и дофаминергической систем мозга. Так, внутримышечное введение половозрелым крысам триметилолова в дозе $14,5$ и $17,5 \cdot 10^{-6}$ моль/кг приводит к снижению плотности M -холинорецепторов на нейронах гиппокампа [64]. В модельных экспериментах на синапсоммах из электрического органа угря *Torpedo marmorata*, чрезвычайно богатого N -холинорецепторами, показано, что преникубация с триметилоловом в концентрации $3,5 \cdot 10^{-3}$ М тормозит высвобождение АХ деполаризующими агентами [65]. Трибутилолово вызывало аналогичный, но менее выраженный эффект, однако в отличие от триметилолова оно стимулировало высвобождение АХ из интактных синапсом [65]. Эффекты триметилолова воспроизведены на переживающих срезах полосатого тела мышей [65]. Таким образом, ООС могут вмешиваться в тонкую регуляцию ацетилхолиновой медиации, что может быть одной из причин нарушения межнейрональной коммуникации в головном мозгу, а также и в периферической и вегетативной НС.

Изменения в системе биогенных аминов мозга наиболее выражены при интоксикации триэтилоловом. Показано, что триэтилолово снижает в головном мозгу уровень норадреналина [66] и дофамина [67] через 7—21 сутки после введения в дозе $22 \cdot 10^{-6}$ моль/кг, а также общее содержание серотонина [68]. Определенное влияние на метаболизм катехоламинов оказывает и триметилолово. Так, через 7 суток после внутрижелудочного введения триметилолова в дозе $39 \cdot 10^{-6}$ моль/кг крысам выявлено снижение уровня дофамина и 3,4-дигидроксифенилацетата в *p. accusbens*, содержания серотонина и повышение уровня 5-гидроксииндолпропионовой кислоты в стриатуме и *p. accusbens* [69]. При этом обнаружено дозозависимое снижение метаболического оборота серотонина при неизменном обороте дофамина [69]. Все это дает основание предположить нарушение регулируемых процессов биосинтеза медиаторов катехоламинового ряда и других биогенных аминов.

Другой точкой приложения действия ООС может быть эффекторный механизм реализации медиаторного действия катехоламинов—аденилатциклазная система. Так, показано, что триэтилово и трифенилолово *in vitro* при добавлении к гомогенатам мозга ингибируют базальную активность аденилатциклазы, не влияя на стимулируемую

норадренином и дофамином активность [70]; в условиях *in vivo*, тем не менее, существенного снижения уровня cAMP под действием ООС не выявлено [70]. В то же время, связывание дофаминового агониста [³H]спиперона с дофаминовым рецептором при интоксикации триметилоловом существенно не изменялось [69].

Таким образом, интоксикация ООС приводит к многообразным нарушениям медиаторных систем мозга. Многие звенья медиаторного цикла (в частности, везикулярная секреция) при этих условиях еще практически не изучены. Однако накопленный материал позволяет сделать заключение, что одним из компонентов нейротоксического действия ООС является нарушение взаимоотношений между медиаторными системами, что, наряду с метаболическими сдвигами, может лежать в основе поведенческих эффектов.

Заключение

Приведенные данные свидетельствуют о множественности механизмов нейротоксического действия ООС. Особое внимание привлекают такие моменты, как нейрометаболические эффекты (угнетение энергетического метаболизма), нарушение биосинтеза белков, в том числе нейроспецифических, нарушение структуры миелина, признаки преимущественного дефицита обусловленного ГАМК центрального торможения, а также нарушения других медиаторных систем. Все эти изменения свидетельствуют о неспецифическом характере повреждающего действия ООС, когда в патологический процесс вовлекается сразу множество жизненно важных для головного мозга явлений. Вероятнее всего, все они являются производными от наиболее общих механизмов влияния ООС на биологические системы. Таковым, по-видимому, является их мембранотропное действие, а после стадий биотрансформации — токсическое действие олова, как тяжелого металла. Об этом, в частности, свидетельствуют данные по измерению содержания SH-групп в тканях [71]. Не исключено также прямое модифицирующее действие ООС на гемсодержащие белки, как на гемоглобин, так и на цитохромы.

В ряде работ продемонстрированы гепатотоксические эффекты ООС [72, 73] и их угнетающее влияние на иммунный статус организма [74, 75], действие на выделительную функцию почек [76]. В связи с этими данными следует ожидать, что некоторые проявления могут быть вторичными, обусловленными влиянием на экстракренальные системы. В то же время, ранние нейроповеденческие и нейроморфологические сдвиги, целый ряд нейрохимических нарушений, в частности нарушение синтеза нейроспецифических белков и состояние миелина, свидетельствуют об избирательной нейротоксичности ООС, что может рассматриваться как специфическое действие данного класса соединений. Многообразие проявлений и механизмов этого действия позволяет на примере ООС представить обобщенную схему, отражающую возможные типы нейротоксических эффектов в соответ-

ствии с современными представлениями о структуре и функции ЦНС.

Эта схема не претендует на исчерпывающую полноту и является попыткой систематизировать все многообразие нейротоксических эффектов, так или иначе реализуемых через нейрохимические процессы, лежащие в основе работы мозга. Она базируется не только на ана-

Гипотезы нейротоксичности и токсикологический эксперимент	Наблюдаемые изменения
Нейроповеденческие	Изменения спонтанной двигательной и исследовательской активности, сенсорных функций, эмоциональной сферы, пищевого и полового поведения, условно-рефлекторной деятельности и консолидации навыков.
Нейрофизиологические	Изменения интегральных показателей деятельности ЦНС, скорости проведения нервных импульсов, состояния нервно-мышечной передачи, изменения функциональной активности нервных центров, нейрональных групп, отдельных нейронов.
Нейроморфологические	Макро- и микроскопические изменения нейроцитов и сосудистого компонента, изменения цитоархитектоники нейронов, ультраструктурные нарушения биомембран, синаптического аппарата, субклеточных структур, изменения нейроглиальных взаимоотношений.
Нейрохимические и иммунологические	Изменения фундаментальных биохимических процессов— энергообеспечения, биосинтеза белка, протеолиза, нарушения надмолекулярной организации энзиматических систем и комплексов, изменения скорости и направленности реакций биокатализа. Сдвиги в содержании и обмене нейроспецифических белков и пептидов, ковалентная модификация белков. Изменения специфических характеристик синаптических процессов—синтеза, везикулярного высвобождения, циторецепции, обратного пресинаптического захвата и глияльного поглощения нейромедиаторов, механизмов функционального сопряжения рецепторных и эффекторных систем, структуры и функции канал-рецепторных образований и аппарата их управления. Развитие аутоиммунных процессов на фоне измененной проницаемости ГЭБ.

лизе приведенного фактического материала, но и на многочисленных данных, представленных в руководстве ВОЗ [6]. Схема намечает также стратегию нейротоксикологического эксперимента, проводимого с целью выявления нейротоксических свойств у ксенобиотиков.

THE MAIN MANIFESTATIONS AND MECHANISMS OF NEUROTOXICITY OF THE TIN-ORGANIC COMPOUNDS

ROSANOV V. A., SHAFRAN L. M.

All-Union Scientific Research Institute of aquatic transport, USSR
Ministry of Public Health, Odessa

The main manifestations and possible mechanisms of neurotoxic effects of a group of tin-organic compounds (TOC) have been represented. The wide spectrum of TOC effect upon the state of vitally important processes in brain (energetic metabolism, biomembrane and myelin state, neurospecific proteins synthesis and functions, synaptic processes) has been demonstrated. The analysis of the main neuromorphological manifestations of toxicity (selective neuronal death in hippocampus) in conjunction with other indications (decrease of GABA content and transport, neurophysiological symptoms of the neuronal hyperactivity) give ground to suppose that the disturbance of central inhibition processes is one of the sufficient components of TOC injuring action upon the nervous tissue. The summarizing scheme of neurotoxic action manifestations and realization mechanisms that determines the strategy of experimental studies of neurotoxicity has been represented.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Хуха Ф. Нейрохимия. Основы и принципы, М., Мир, 1990.
2. Caatsch C. G. Vierteljahresschr. Naturforsch. Ges. Zürich, B. 132, № 4, S. 191—254, 1987.
3. Harvey A. L., Anderson A. J. Pharmacol. and Ther., v. 31, № 1—2, p. 33—55, 1985.
4. Experimental and clinical neurotoxicology (ed. by Spencer P. S., Schaumburg H. H.) Baltimore, Williams and Wilkins Company, 1980.
5. Anger W. K. Neurobehav. Toxicol. Teratol. v. 6, p. 147—153, 1984.
6. Principles and methods for the assesment of neurotoxicity associated with exposure to chemicals, WHO, Geneva, 1986.
7. Иваницкий А. М. Фармакология и токсикология, т. 26, № 5, с. 629—632, 1963.
8. Мазас В. Т., Изумнов А. С., Цай В. Н., Шлеппина Т. Г. Гигиена и санитария, № 4, с. 14—18, 1977.
9. Klein E., Woggon H. Z. gesamt. Hyg., B. 29, № 5, S. 246—249, 1983.
10. Данишевский С. Л. Олово и его соединения.—В кн.: Вредные вещества в промышленности, т. 2, Л., Химия, 1971.
11. Олово и оловоорганические соединения (предварительный обзор), Сер. Гигиенические критерии состояния окружающей среды, Женева, ВОЗ, 1984.
12. Reuhl K. R., Cranmer J. M. Neurotoxicology, v. 5, p. 187—204, 1984.
13. Morell P., Mailman R. B.—in: Neurotoxicants and neurobiological functions Effects of organohheavy Metals (ed. by H. A. Tilson, S. B. Sparber). N. Y., John Wiley and Sons, p. 202—229, 1987.
14. McMillan D. E., Wenger G. R. Pharmacol. Rev., v. 37, № 4, p. 365—379, 1985.
15. Snoei N. G., Gersel A. A. J., Van, Penninks A. H., Seinen W. Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 81, № 2, p. 274—286, 1985.
16. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. ГОСТ ССБТ (12.1.007-76).

17. *McMillan D.* Environ. Health Respect., v. 76, p. 155—164, 1987.
18. *Brown A. W., Aldridge W. N., Street B. W., Verschoyle R. D.* Am. J. Pathol., v. 97, p. 59—82, 1979.
19. *Swartzwelder H. S., Dyer R. S., Holakan W., Myers K. D.* Neurotoxicology, v. 2, № 3, p. 589—593, 1981.
20. *Evans H. L., Bushnell P. J., Reuhl K. D., Graere J. F.* Toxicologist, v. 6, № 1, p. 21, 1986.
21. *Sparber S. B., Cohen C. A., Messing R. B.* Life Sci., v. 42, № 2, p. 171—177, 1988.
22. *Idemudia S. O., McMillan D. E.* J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 243, № 1, p. 241—246, 1987.
23. *Myers R. D., Swartzwelder H. S., Dyer R. S.* Psychopharmacology, v. 78, № 1, p. 24—32, 1982.
24. *Peele D. B., Farmer J. D., Coleman J. F.* Psychopharmacology, v. 97, p. 521—528, 1989.
25. *Ruppert P. H., Dean K. F., Reiter L. W.* Toxicol. Lett., v. 23, № 1, p. 33—38, № 1, 1984.
26. *Harry G. J., Tilson H. A.* Neurotoxicology, v. 2, № 2, p. 283—296, 1981.
27. *Reiter L., Kidd K., Heavner G., Ruppert P.* Neurotoxicology, v. 2, № 1, p. 97—111, 1981.
28. *Young J. S., Fechter L. D.* Toxicol. and Applied Pharmacol., v. 82, p. 87—93, 1986.
29. *Crofton K. M., Dean K. F., Boucek V. M., Rosen M. B., Sheets L. P., Chernoff N., Reiter L. W.* Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 97, № 1, p. 113—123, 1989.
30. *Мазеев В. Т., Лосев Н. И., Волков В. А.* Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 66, № 11, с. 72—74, 1968.
31. *Pluta R., Ostrowska B.* Neuropathol. Pol., v. 25, № 1, p. 71—80, 1987.
32. *Tanigro D. A., Schwartzkroin P. A., Costa L. G.* Toxicologist, v. 6, № 1, p. 263—269, 1986.
33. *Chang L. W., Wenger G. R., McMillan D. E.* Environ. Res., v. 34, № 1, p. 123—234, 1984.
34. *Chen J. J., Ali S. F., Slikker W., Reuhl K. P.* Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 84, № 2, p. 412—417, 1986.
35. *Cockerill D. W., Chang L. W., Bivins F. G., Hough A.* Toxicologist, v. 6, № 1, p. 51—57, 1986.
36. *Meldrum B., Griffiths T., Evans M.* Protection of tissues against hypoxia (ed. A. Wanquer et al.), Amsterdam, Elsevier Biomed. Press, p. 275—285, 1982.
37. *Wieloch T.* Progr. Brain Res., v. 63, p. 69—89, 1985.
38. *Siesjo B. K.* Mayo Clin. Proc., v. 61, № 4, p. 299—302, 1986.
39. *Bivins F. G., Chang L. W., Cockerill D. W., Hardin J., Hough A.* Toxicologist, v. 6, № 1, p. 50—55, 1986.
40. *Chang L. W.* Bull. Environ. Contam. and Toxicol., p. 245—301.
41. *Hulstrom D., Torssen M., Petersson A., Tengvar C., Jarild M., Olsson J.* Acta Neurol. Scand., v. 69, № 5, p. 255—263, 1984.
42. *Kirschner A. A., Sapirstein R. S.* J. Neurocytol., v. 11, № 4, p. 559—569, 1982.
43. *Amochaev A., Johnson R. S., Salamy A., Shah S. N.* Exp. Neurol., v. 66, p. 629—635, 1979.
44. *Lock E. A.* Biochem. Pharmacol., v. 25, p. 1455—1458, 1976.
45. *Lock E. A., Aldridge W. N.* J. Neurochem., v. 25, p. 871—876, 1975.
46. *Brody T. M., Moore K. E.* Fed. Proc., v. 21, p. 1103—1106, 1962.
47. *Lock E. A.* Neurochem., v. 26, p. 887—892, 1976.

48. Загоскин П. П., Хаатова Е. М., Шербаков В. Н. Хим. фармацевт. журн., № 11, с. 16—19, 1982.
49. Jacobs K. S., Lemasters J. J., Reiter L. W. Toxicol. Lett., v. 18, Suppl. 1, p. 91—94, 1983.
50. Ally A. I., Vieira L., Reuhl K. R. Toxicology, v. 40, № 2, p. 215—229, 1986.
51. Hasan M., Heider S., Bajpai V. K. Int. Health, v. 22, № 2, p. 107—116, 1984.
52. Beria B., Rapelli S., Montofraro G., Sparber S. B. Ital. J. Biochem., v. 38, № 2, p. 93—98, 1989.
53. Macovschi O., Prigent A.—F., Nemoz H., Pageaux J.—F., Pascheco H. Biochem. Pharmacol., v. 33, № 22, p. 3603—3608, 1984.
54. Miller D. B., O'Callaghan J. P. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 321, № 3, p. 744—751, 1984.
55. O'Callaghan J. P., Miller D. B. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 231, № 3, p. 746—743, 1984.
56. Brock T. O., O'Callaghan J. P. J. Neurosci., v. 7, № 4, p. 931—942, 1987.
57. O'Callaghan J. P., Miller D. B. J. Pharmacol. and Exp. Ther., v. 246, № 1, p. 394—402, 1988.
58. Crofton K. M., Dean K. F., Boncek V. M., Rosen M. B., Sheets L. P., Chernoff N., Reiter L. N. Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 97, № 1, p. 113—123, 1989.
59. Mailman R. B., Krigman M. R., Frye M. R., Hemin I. J. Neurochem., v. 40, № 5, p. 1423—1429, 1983.
60. Doctor S. V., Costa L. G., Murphy S. D. Toxicol. Lett., v. 18, Suppl. 1, p. 17, 1983.
61. Costa L. G., Doctor S. V., Murphy S. D. Life Sci., v. 31, № 11, p. 1093—1102, 1982.
62. Zimmer L., Wolley D., Chang L. Life Sci., v. 36, № 9, p. 851—858, 1985.
63. Doctor S. V., Costa L. G., Murphy S. D. Toxicol. Lett., v. 13, p. 217—223, 1982.
64. Loullis C. C., Dean L. J., Lipka A. S., Clody D. E. Pharmacol. Biochem. and Behav., v. 22, № 1, p. 147—151, 1985.
65. Morot-Gaudry. Neurochem. Int., v. 6, № 4, p. 553—561, 1984.
66. Moore K. E., Brody T. M. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 132, p. 6—12, 1961.
67. Cook L. L., Heath S. N., O'Callaghan Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 73, p. 504—563, 1984.
68. Doctor S. V., Fox D. A. J. Toxicol. Environ. Health., v. 10, p. 43—52, 1982.
69. De Haven D. L., Walsh T. J., Mailman R. B. Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 75, № 2, p. 182—189, 1984.
70. Leow A. C. T., Towns K. M., Leaver D. D. Chem.-Biol. Interact., v. 27, № 1, p. 125—132, 1979.
71. Doctor S. V., Sultatos L. G., Murphy S. D. Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 70, № 1, p. 165—168, 1983.
72. Wiebkin P., Prough R., Bridges J. W. Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 62, № 3, p. 409—420, 1982.
73. Левицкая В. Н., Алексина С. М. Гигиена и санитария, № 1, с. 91—92, 1985.
74. Snoeijs N. J., Van Jersel A. A. J., Penninks A. H. Toxicology, v. 39, № 1, p. 71—83, 1986.
75. Miller K., Maisey J., Nicklin S. Environ. Res., v. 39, № 2, p. 434—441, 1986.
76. Opacka J., Sparrow S. Toxicol. Lett., v. 27, № 1—3, p. 97—102, 1985.

Поступила 27. I. 1991

Письма в редакцию

УДК 577.152—615.015

ВЛИЯНИЕ ГИПОТАЛАМИЧЕСКОГО ФАКТОРА НА СОКРАТИТЕЛЬНУЮ СПОСОБНОСТЬ ГЛАДКОЙ МУСКУЛАТУРЫ АОРТЫ

АЛЕКСАНИАН А. Р.

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

Открытие в 60-х годах кардиоактивных нейрогормонов гипоталамуса—регуляторов сердечного кровообращения [1] и, в последующем, их множественных форм [2] показали, что эндокринный гипоталамус регулирует сердечную активность.

В системе исследований Отдела биохимии нейрогормонов Института биохимии АН Армении по выделению и изучению как коронаро-расширяющих, так и коронаросуживающих нейропептидов гипоталамуса и сердца, значительный интерес представляет группа коронаро-расширяющих соединений типа нейрогормона «С», которые были охарактеризованы как полициклические соединения непептидной природы, так как они в значительной степени сохраняются при ферментативном, кислотном и щелочном гидролизе.

Недавно Галояном и соавт. были выделены из гипоталамуса крупного рогатого скота четыре соединения, которые условно были названы веществами 1, 2, 23, 44. Были изучены физико-химические свойства кардиотропных соединений ЯМР, ЭПР и масс-спектральным анализом. Полученные данные свидетельствуют о сложном полициклическом характере этих веществ [3].

Учитывая ингибирующее влияние одного из кардиотропных веществ (44) на Ca^{2+} -кальмодулинзависимую фосфодиэстеразу и на фосфорилирование легких цепей миозина, представляет интерес изучение влияния этого вещества на сократительную способность гладкой мускулатуры аорты.

Низкомолекулярные соединения гипоталамуса, содержащие множественные формы кардиотропных соединений, получали по методу, описанному ранее [4]. Разделение осуществляли методом ВЭЖХ в обратнотазовом решении. Кардиотропную активность определяли по ранее описанному методу [5]. Влияние соединения 44 на гладкую мускулатуру грудной аорты кролика определяли следующим методом:

белых кроликов массой 2,3—2,7 кг умерщвляли эмболией через ушную вену и быстро изолировали аорту.

После удаления окружающих тканей аорту спиралеобразно вырезали под углом 45° . При этом образованную полоску шириной 2,5 мм и длиной 30 мм помещали в рабочую камеру, содержащую раствор следующего состава (в мМ): NaCl —39,7, KCl —80, $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ —1,2, NaHCO_3 —25, KH_2PO_4 —1,2, глюкоза—10,0 мМ [6]. Раствор камеры при температуре $37 \pm 0,5^\circ$, pH 7,4, аэрировали смесью 95%— O_2 , 5%— CO_2 . Механическую активность сосудистой мускулатуры изучали в изометрическом режиме с помощью двуханодного диодного меха-

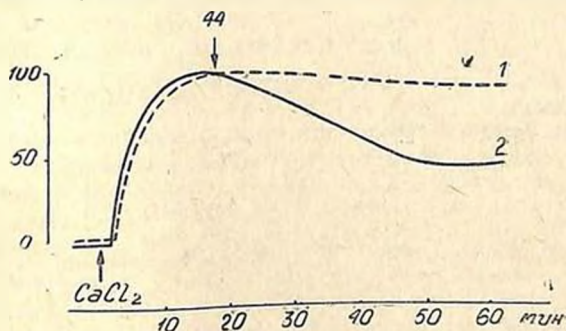


Рис. Влияние вещества 44 на сокращение полоски грудной аорты кролика. Максимальное сокращение, вызываемое CaCl_2 ($3 \cdot 10^{-4}$ М), приняли за 100% (1). Стрелкой указано время, когда в среду добавляли вещество 44 (2)

трона типа 6МХХ2Б. Для записи механограммы использовали самописец (Endim), скорость движения составляла 1,6 мм в мин, нагрузка на препарат равнялась 2 г. Препарат сначала инкубировали в течение 1 ч, а затем добавляли CaCl_2 в концентрации $3 \cdot 10^{-4}$ М, вызывая сокращение аорты и на этом фоне рассматривали действие вещества 44. Эта концентрация CaCl_2 вызывает сокращение полоски аорты, которое доходит до плато, достигая устойчивого состояния и сохраняется на этом уровне в течение нескольких часов. На этом фоне добавляли вещество 44 ($2 \cdot 10^{-3}$ опт. ед.). Эта доза вызывала постепенную релаксацию аорты на 40—50% в течение 1 ч (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о прямом и весьма эффективном влиянии этого нового гипоталамического кардиотропного фактора на гладкую мускулатуру аорты и подтверждают наше предположение о том, что вещество 44, ингибирующее фосфорилирование легких цепей миозина, должно вызывать релаксацию гладкой мускулатуры.

INFLUENCE OF HYPOTHALAMIC FACTOR ON AORTA SMOOTH MUSCLE CONTRACTILITY

ALEKSANIAN A. R.

H. Ch. Buntatian Institute of Biochemistry, Armenian Academy of Sciences, Yerevan

The effect of a cardiotropic compound isolated from hypothalamus inhibited Ca-CM-dependent PDE and myosin light chain phosphorylation upon aortic smooth muscle contractility has been investigated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 4, № 3, с. 109—111, изд-во АН АрмССР, Ереван, 1962 г.
2. Галоян А. А. Вопросы биохимии мозга, изд-во АН АрмССР, т. 13, с. 9—38, 1978.
3. Ga'oyan A., Chistikian M., Galoyan K., Chalian S., Ulanovsky I., Antonian A., Pabaiyan M., Shatalova L., Aleksanian A., Sharova N. 8-th gen. meeting of Europ. society for Neurochemistry, p. 102—103, Leipzig 1990.
4. Галоян А. А. ДАН АрмССР, т. 48, № 5, с. 284, 1969.
5. Галоян А. А. Третья Всесоюзная конференция по биохимии нервной системы, сб. докл. под ред. Палладина А. В. и Бунятяна Г. Х., Ереван, с. 517, 1962.
6. Masqshi Kanamory, Michiko Naka, Moshahisa Asano Hiroyoshi Hiduka. The J. of Pharmac. and Exper. Therap. v. 217, № 2, 1981.

Поступила 15. IV. 1991

Biophysical Chemistry of Membrane Functions (ed. A. Kotyk, K. Janacek, J. Korytu), J. Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester, 396 p., 1988.

Биофизическая химия функций мембран.

В книге приведена сбалансированная информация о биологии, химии и физике мембран, их специфических функциях, связанных с транспортом веществ, переносом энергии и преобразованием сигналов. Содержащиеся в книге современные данные о столь разнообразных свойствах и функциях позволяют использовать ее в качестве универсального справочника по таким вопросам, как строение и состав мембран, все известные к настоящему времени системы транспорта, разнообразные механизмы переноса энергии и отдельные типы трансформации сигналов.

ХРОНИКА

К 80-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ Н. Н. ДЕМИНА

Исполнилось 80 лет одному из замечательных советских нейрохимиков профессору Николаю Николаевичу Демину. Основные вехи его жизненного пути и научно-общественной деятельности были изложены в юбилейной статье, посвященной его 75-летию (Нейрохимия, т. 5, с. 85—87, 1986). Сегодня нам представляется целесообразным остановиться более подробно на научных достижениях проф. Н. Н. Демина, не нашедших полного отражения в той публикации.

Воспитанник Ленинградского государственного университета, сформировавшийся под влиянием акад. А. Д. Сперанского и проф. Е. С. Лондона, Николай Николаевич Демин очень рано посвятил себя функциональной биохимии. В 1935—40-ые годы им была выполнена серия работ по изучению гомеостатической функции эритроцитов в отношении концентрации аминокислот (и полипептидов) в плазме крови. В 1946—начале 70-ых годов сотрудниками Николая Николаевича в разных лабораториях был проведен большой цикл исследований по экспериментальной разработке его основополагающей оригинальной идеи о том, что нейромедиаторы, в частности ацетилхолин, не только участвуют в передаче нервных импульсов, но могут играть и более широкую роль как модуляторы многих метаболических процессов. Было установлено, что действие ацетилхолина на клеточный метаболизм осуществлялся прежде всего через изменение свойств мембранных структур (не только синаптических, но и других, включая внутриклеточные), а синаптические эффекты ацетилхолина являются частным случаем его общей мембранной активности.

В результате космобиологических исследований проф. Демина и соавт. (1961—82-ые годы) были охарактеризованы нейрохимические последствия космических полетов подопытных крыс; особо следует отметить, что установленное им в свое время совместно с А. А. Гурджаном, Н. В. Корнцовой и др. отсутствие следов влияния космической радиации на метаболизм у собак, перенесших космический полет, явилось одной из важных предпосылок для организации полета в космос человека.

Начиная с конца 60-х годов, под руководством Николая Николаевича в лаборатории функциональной нейрохимии Института физиологии им. И. П. Павлова АН СССР были широко развернуты работы по выявлению ряда метаболических коррелятов сна и экспериментальных нарушений циклов бодрствование-различные фазы сна. Такие исследования были проведены на различных специфических

структурах головного мозга, имеющих отношение к регуляции динамики этих циклов. Но если в настоящее время активно развивающееся изучение нейрохимических процессов во время сна сводится, в основном, к выявлению нейромедиаторных и нейромодуляторных механизмов его динамики с исследованием метаболизма соответствующих биоактивных веществ, то ценность работ проф. Н. Н. Демина связана прежде всего с тем, что он сконцентрировал внимание на остающихся пока мало изученными фундаментальных внутриклеточных процессах во время сна. Так, были исследованы сдвиги метаболизма белков и РНК в отдельных клетках нервной ткани (телах нейронов и окружающих их глиоцитах). На основе многочисленных собственных и некоторых литературных данных проф. Н. Н. Деминым была сформулирована достаточно аргументированная гипотеза о причинах биологической необходимости сна. В 1988 году он писал, что причиной потребности в периодических эпизодах сна может быть необходимость восстановления нормальной структуры липопротеидных компонентов, в первую очередь, синаптических мембран, которые прогрессивно денатурируются при бодрствовании; при этом было подчеркнуто, что для репаративных процессов в нейронах особенно важна именно парадоксальная фаза сна.

В последние годы Николай Николаевич занялся нейрохимическими исследованиями другого, весьма своеобразного состояния деафферентации, причем длительного, гипобиотического характера (зимняя спячка млекопитающих) — состояния, хорошо контролируемого определенными структурами головного мозга. В результате проведенных исследований (на кавказских сусликах) был установлен тот существенный факт, что, несмотря на температуру головного мозга, снижающую до 3—4°, в некоторых ядрах гипоталамуса и шва происходят сложные процессы метаболизма белков и РНК, имеющиеся в динамике зимней спячки. На основании собственных экспериментальных данных, а также имеющихся материалов других исследователей проф. Н. Н. Деминым в соавторстве с Т. Х. Щортановой и Э. З. Эмирбековым была опубликована не имеющая еще аналогов в мировой литературе монография «Нейрохимия зимней спячки млекопитающих» (Л., «Наука», 1968).

Перу проф. Н. Н. Демина принадлежит около 160 научных публикаций, в число которых входят 3 монографии и ряд крупных обзоров. Он является заслуженным членом Международного (ISN) и Европейского (ESN) нейрохимических обществ, а также Международной организации изучения мозга (IBRO).

Николай Николаевич вносит большой вклад в работу нашего журнала, принимая постоянное участие в рецензировании и редактировании публикуемых в нем статей.

Редколлегия журнала «Нейрохимия» сердечно поздравляет дорогого Николая Николаевича с замечательным юбилеем и желает ему крепкого здоровья, неустанных сил и новых творческих достижений.

РЕДКОЛЛЕГИЯ

**ВСЕСОЮЗНЫЙ СИМПОЗИУМ «ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ
И КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ»**

(27—29 декабря 1990 г., Нижний Новгород)

С 27 по 29 декабря 1990 года в Нижнем Новгороде проходил Всесоюзный симпозиум «Физиологическое и клиническое значение регуляторных пептидов». В организации симпозиума принимали участие Академия наук СССР, Академия медицинских наук СССР, министерство здравоохранения СССР, Горьковский научно-исследовательский педиатрический институт.

На симпозиуме были рассмотрены итоги исследований по проблеме регуляторных пептидов (РП), проведенных в нашей стране в течение последних лет и намечены наиболее перспективные направления дальнейших исследований.

В работе симпозиума приняли участие 139 человек. Было проведено одно пленарное и 7 секционных заседаний. Пленарное заседание было посвящено кардинальным проблемам современной пептидологии, на секционных заседаниях рассматривались фундаментальные и эволюционные проблемы физиологии пептидов, структура и функциональные свойства РП, мембранные и молекулярные механизмы действия РП на возбудимые структуры, структурно-функциональная организация передачи информации РП, РП в регуляции функций нервной и висцеральной систем организма, использование РП в клинической практике.

В докладе *А. М. Уголева* (Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград) были изложены основные проблемы эволюции эндогенных регуляторных олигопептидов и представлен прогноз дальнейших исследований гормональной системы желудочно-кишечного тракта. Приведены многочисленные примеры структурного сходства и различия пептидных молекул, выделенных из эволюционно далеких биологических источников, показано функциональное разнообразие гомологических структур и функциональное сходство пептидов с сильно различающейся последовательностью аминокислотных остатков. Эта информация представляет собой богатейший материал для формулирования основных принципов эволюции функций, для объяснения явления полифункциональности (полипотентности) и для характеристики целого ряда других важнейших физиологических явлений.

Принципиальным вопросам методологии исследования биологического действия пептидов был посвящен доклад *И. П. Ашмарина* (Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова) «Пря-

мые, косвенные и иллюзорные эффекты пептидов-бioreгуляторов». Докладчик обратил внимание на то, что заключения о новых физиологических функциях РП часто делаются на основании использования доз или концентраций РП, в 10^3 — 10^6 раз превышающих их содержание в тканях и жидкостях организма. Следует при этом учитывать, что реальные концентрации свободных РП в 10^2 — 10^3 раз ниже определяемых с помощью радиоиммунных и иммуноферментных методов, так как РП действуют и транспортируются связанными с белками-носителями. В связи с этим наиболее адекватно исследование эффектов концентраций в 10^2 — 10^3 меньших, чем те, которые описываются как средние при использовании радиоиммунных и иммуноферментных методов. Неправомерны оценки эффектов РП, основанные только на повышении их концентрации; действительная оценка может быть дана только с учетом эффекта снижения концентрации РП. Решение вопроса о прямом или косвенном происхождении наблюдаемого эффекта РП возможно лишь при выявлении рецепторов к данному РП. Исходя из изложенных соображений, *И. П. Ашмарин* сформулировал минимальные требования к объективности оценки того, насколько выявленная биологическая активность данного РП обеспечивает его физиологические функции в организме. Минимальный комплекс тестов, позволяющих признать эффект пептида соответствующим его биохимическим и физиологическим функциям в организме включает:

- а) изучение действия пептида в концентрациях, превышающих средние концентрации в тканях и жидкостях организма не более, чем в 100 раз;
- б) изучение действия «сверхмалых» концентраций (10^{-12} М и менее);
- в) изучение эффектов пассивной иммунизации к пептиду;
- г) изучение эффектов активной иммунизации к пептиду;
- д) выявление рецепторов к пептиду, локализованных в клетках, тканях и органах, прямо связанных с биохимическим и/или физиологическим эффектом.

Веским подкреплением положения о тесной взаимосвязи и взаимодействии эндогенных пептидов могут служить данные, приведенные в обстоятельном сообщении *П. К. Климова и Г. М. Барашковой* (Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова, Ленинград). Согласно этим данным, отклонения от базального уровня любого из регуляторных пептидов обязательно воспринимаются рецепторами соответствующих структур как мозга, так и висцеральных органов, что приводит к изменениям содержания других пептидов в крови. Так, введение через ту же самую канюлю в бледный шар соматостатина снижало содержание в крови эндогенного гастрина, а введение метэнкефалина, напротив, повышало содержание гастрина; введение субстанции «Р» вызывало незначительные изменения содержания в крови гастрина и инсулина, но достоверные изменения содержания соматостатина и вазопрессина. Инъекция субстанции «Р» в хвостатое ядро увеличивала содержание в крови инсулина в

течение 90 мин. Обобщая результаты многолетних исследований, *П. К. Климов* объяснил физиологическое действие регуляторных пептидов специфичностью молекулярного кода, многовариантностью рецепторов клеток-мишеней, каскадным действием пептидов. Он сформулировал «камертонный» принцип отражения содержания пептидов мозга в периферической крови, выдвинул представления о меняющемся «образе» пептидной мозаики при смене физиологических ситуаций, обосновал тесную взаимосвязь регуляторных пептидов с другими эндогенными веществами организма, в том числе — с моноаминами при рефлекторных актах в пищеварительной системе. Предложенный им «камертонный» принцип действия пептидов по существу отражает тот факт, что пептиды образуют всеобразные функциональные семейства с центральными звеньями, «прикосновения» к которым сказывается на сонатросных периферических звеньях («камертонный» эффект).

Выдвинутое *П. К. Климовым* представление о «камертонном» эффекте, как и каскадные однонаправленные регуляторные процессы, осуществляемые короткоживущими пептидами, отражают системный характер действия РП. РП функционируют не автономно, а в тесной связи с другими РП и эндогенными веществами так, что наблюдаемый эффект всегда представляет собой результат включения системы РП и других эндогенных веществ. Системному характеру эффектов РП был посвящен и доклад *Р. И. Кругликова* (Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии АН СССР, Москва), рассмотревшего место нейропептидов в нейрохимических механизмах обучения и памяти. В докладе были приведены данные об участии РП в регуляции функционирования нейрохимических систем, обеспечивающих интегративную деятельность мозга. В частности, было показано, что влияние РП на процессы обучения и памяти зависит от состояния нейромедиаторных систем мозга. В свою очередь, РП модулируют активность нейромедиаторных систем, модифицируя их влияние на процессы обучения и памяти.

Совокупность полученных данных позволяет видеть в системных эффектах РП механизм системной детерминации деятельности организма. *О. А. Гомазков* посвятил свой доклад проблеме уровней молекулярной и структурной организации системы РП в клетке. Выдвинутая автором концепция включает три основных положения, суть которых состоит в следующем. Все этапы синтеза РП и их секреция контролируются обратными связями, зависящими от характера и интенсивности вызываемого РП эффекта, реализующимися через соответствующие рецепторы, активация которых в конечном счете приводит к изменениям активности генетического аппарата клеток. В одной и той же клетке могут синтезироваться несколько предшественников и далее — РП. Вместе с тем биогенез РП в разных тканях носит специфический характер, определяемый особенностью данной ткани. Изложенные положения составляют теоретическую схему взаимосвязи между биосинтезом и функциями РП.

С обобщением многолетних исследований до эволюционным аспектам пептидологии выступила *Т. Н. Солертинская* (Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова, Ленинград). Исследования, основанные на теории *А. И. Карамяна* о критических этапах развития интегративной деятельности мозга в филогенезе, позволили установить, что нейрохимическая пептидная регуляция поведенческой активности в эволюции реализуется по общему принципу развития от диффузных неспециализированных форм влияния к дискретным специализированным формам. Предполагается, что распределение и содержание РП в ядрах мозговых структур коррелирует с их влиянием на ЦНС.

Среди материалов, посвященных эволюционным аспектам пептидологии, большой интерес представляют также результаты изучения влияния РП на пищеварительные функции у рыб (*П. К. Климов, И. А. Шпарковский*, Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР, Ленинград; Мурманский морской биологический институт Кольского научного центра АН СССР). В хронических экспериментах на рыбах разного филогенетического уровня и экологической специализации исследованы влияния внутривенного или интрацентрального введения ряда РП на двигательную и миелектрическую активность пищеварительного тракта, интенсивность питания и пищевое поведение. Обнаружена зависимость эффектов РП от способа введения, исходного функционального состояния, видовых особенностей рыб, выявлены некоторые нейрохимические механизмы исследованных реакций. Высказано предположение о наличии у рыб рецепторов к некоторым РП.

Оригинальное представление об участии регуляторных пептидов в формировании и поддержании устойчивых функциональных состояний организма выдвинули *С. А. Титов, О. И. Маликонова* (Институт системных исследований АН СССР). Исходя из концепции акад. *И. П. Ашмарина*, в соответствии с которой освобождение или эндогенное введение определенного пептида вызывает запуск каскадного процесса выброса одних соединений при ингибировании освобождения других, авторы полагают, что каждый из освобожденных пептидов регулирует скорость выброса не только новых пептидов, но и тех, которые принадлежат предыдущим ступеням каскада. Таким путем формируется система с большим числом положительных, отрицательных и взаимоугнетающих обратных связей. Соотношение концентраций функционирующих пептидов и непептидных соединений создают определенный нейрохимический «фон» или «контекст», который в значительной мере предопределяет реакции организма на разнообразные воздействия. Авторы предполагают, что разработанные на основании этих предпосылок модели позволят оценивать состояние организма и прогнозировать, в частности, реакции на введение фармакологических препаратов.

Ряд сообщений был посвящен дизайну пептидов. В докладе *Л. К. Полевой* (Институт органического синтеза АН Латвийской

СССР) были рассмотрены молекулярные механизмы эффектов некоторых вазоактивных пептидов и особенности специфических клеточных рецепторов. Учет особенностей рецепторов позволяет осуществлять модификации природного пептида, направленные на повышение его стерической и функциональной комплементарности с рецептором.

Т. А. Гудалиева и соавт. (НИИ фармакологии АМН СССР) обобщили новый принцип пептидного дизайна. Этот принцип исходит из предположения о том, что многие лекарственные вещества с неизвестным механизмом действия проявляют свою активность через пептидергические рецепторы. Отсюда вытекает возможность конструирования новых биологически активных олигопептидов, исходя из структуры лекарственных веществ. Путем такого пептидного дизайна классического ноотропа пирacetama получена группа дипептидов-ноотропов, активность которых в 10^3 раз превосходит активность пирacetama. Интересно, что один из высокоактивных дипептидов—Pyr-Asp-NH₂ представляет собой фрагмент и возможный метаболит вазопрессина. По данным *Р. У. Островской и соавт.* (НИИ фармакологии АМН СССР), такие дипептиды нормализуют высшие интегративные функции мозга, нарушенные различными повреждающими воздействиями. Большого внимания заслуживает выявленная авторами способность исследованных пептидов нормализовать врожденные нарушения процессов обучения и памяти у животных, подвергавшихся воздействию алкоголя в пренатальном периоде.

Физиологическим эффектам синтетических аналогов трех ранее неизвестных пептидов, выделенных из мозга быка, было посвящено сообщение *В. В. Шерстнева и соавт.* (Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР, Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР). Детально охарактеризовав поведенческие эффекты трех аналогов, авторы пришли к заключению о целесообразности дальнейшего изучения роли исследованных аналогов в механизмах агрессивности, обучения и памяти.

Убедительные данные о биологических эффектах пептидов семейства бомбезинов представили *А. Т. Марьянович и соавт.* (Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова, Ленинградский государственный университет). Как показали авторы, введение бомбезина в мозг вызывает брадикардию, системную гипертензию и вазодилатацию в специализированных органах теплоотдачи. Введение бомбезина кроликам с предварительно удаленными ушными раковинами не вызывает гипотермии. Сопоставляя влияние на терморегуляцию бомбезина, нейротензина и субстанции Р, авторы показали, что бомбезин повышает теплоотдачу без увеличения теплопродукции, а два других пептида стимулируют оба процесса. Факт существования в головном мозгу эндогенных бомбезинподобных пептидов указывает, по мнению авторов, на их участие в центральных механизмах регуляции кровообращения.

А. Е. Громова и соавт. (Институт биофизики АН СССР, Институт белка АН СССР) провели сравнительный анализ влияния апа-

логов Леу-энкефалина на исследовательское поведение крыс. Авторами выявлена зависимость эффектов пептидов от времени и дозы введения вещества. Физиологическая активность исследованных аналогов Леу-энкефалина обусловлена их химической структурой.

Новые данные о биологических эффектах пептида дельта-сна (ПДС) привел в своем сообщении *В. М. Ковальзон* (Институт эволюционной морфологии и экологии животных им. А. Н. Северцова АН СССР). В тщательных исследованиях не удалось обнаружить гипногенной активности ПДС, но такая активность была обнаружена у некоторых аналогов ПДС с повышенной устойчивостью к аминопептидазам. Предполагается, что гипногенные эффекты аналогов ПДС связаны с их взаимодействием с нейропептидами, участвующими в регуляции сна. Как отмечает автор, в настоящее время формируется представление о ПДС как о трофотропном гормоне, который является новым, ранее не известным звеном эндокринной регуляции организма.

В докладе *А. М. Уголева, А. Д. Дмитриева и М. Б. Смирновой* «Кишка как двойной эндокринный орган» представлены экспериментальные доказательства того, что в эндорфинпродуцирующих клетках кишечника (нервных, эндокринных и клетках иммунной системы) могут иметь место два типа негативной регуляции синтеза эндорфинов: в одних клетках синтез эндорфинов может подавляться глюкокортикоидами, как это имеет место в клетках передней доли гипофиза, в других клетках синтез эндорфинов может подавляться дофамином, как это происходит в клетках промежуточной доли. Путем расчленения тонкого кишечника крыс на слизистый и мышечно-серозный слои показано, что до 80% иммунореактивного гастрина локализуется в мышечно-серозном слое. Таким образом, по крайней мере в тонком кишечнике крыс основными продуцентами пептидов могут быть нервные клетки, а не эндокринные, как считалось до сих пор.

В. Г. Зилов, С. К. Рогачева, Л. И. Иванова (кафедра нормальной физиологии I ММИ им. И. М. Сеченова) сообщили о повышении толерантности оборонительной мотивации к этанолу под влиянием субстанции Р. Обобщая собственные и литературные данные, авторы пришли к важному заключению о возможности использования пептидов в качестве средств, повышающих устойчивость организма к этанолу или подавляющих отрицательное влияние алкоголя на формирование целесообразного поведения.

Большое внимание участников симпозиума привлекло сообщение *М. В. Козловой и В. А. Коленчука* (Институт экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН СССР) о нейротрофических эффектах опиоидных пептидов и вещества Р. В экспериментах, проведенных на диссоциированных культурах спинного мозга, было обнаружено повышение выживаемости нейронов под влиянием Леу-энкефалина, далагрина и субстанции Р. Отмечены усиление нейритного роста и изменения адгезивности. Как полагают авторы, отмеченные эффекты мо-

гут лежать в основе лечебного действия даларгина при боковом амиотрофическом склерозе.

Принципиальные вопросы классификации эндогенных регуляторных омегопептидов затронули в своих докладах А. А. Замятин и Т. В. Стрекало (Институт нормальной физиологии им. П. К. Анохина АМН СССР, Москва). На основании анализа современных подходов к структурной классификации олигопептидов А. А. Замятин пришел к заключению о том, что задача классификации олигопептидов сводится к сравнительному анализу первичных структур. Автором предложен 50%-ный критерий оценки гомологии первичных структур. Предлагаемый критерий может быть использован для анализа дипептидов и даже «монопептидов», то есть аминокислот. Что касается функциональной классификации эндогенных регуляторных омегопептидов, то основу такой классификации могут составить наборы клеток, обладающих рецепторами к данному пептиду и реализующих ту или иную форму функциональной активности.

С помощью компьютерного подхода продемонстрировано многообразие структур и функций физиологически активных олигопептидов, дана характеристика первого в нашей стране специализированного банка данных EROP—Moscow. Совокупность данных этого банка была рассмотрена как самостоятельный объект исследования, что позволило автору провести структурную классификацию природных аминокислотных последовательностей, в результате чего получены группы структурно и функционально родственных молекул. Результаты этой классификации в дальнейшем использовались для выявления функционально-значимых химических радикалов, характерных для физиологически активных веществ пептидной природы. О банке данных по структурно-функциональной организации и активности пептидов и белков-регуляторов сообщили А. М. Ерошкин и соавт. (НПО «Вектор», ВНИИ молекулярной биологии, Новосибирская область).

Большой интерес участников симпозиума вызвал доклад А. И. Масюка, В. К. Рыбальченко и соавт. (Институт физиологии Киевского университета), в котором рассматривалось взаимодействие вазопрессина и субстанции Р с плазматической мембраной гепатоцитов.

Взаимодействие пептидных гормонов субстанции Р с плазматической мембраной клетки начинается с их погружения в липидную фазу мембран. Затем вследствие изменения конформации молекулы субстанции Р оказывается возможным ее взаимодействие с неспецифическими рецепторами, в результате которого активизируются системы вторичных посредников и реализуется соответствующий физиологический эффект. В этой связи интересно, что А. А. Болдырев в монографии «Биологические мембраны и транспорт ионов» (М., Изд. МГУ, 1985) высказал предположение о том, что безрецепторное действие нейропептидов осуществляется помимо влияния на специфические нейрональные рецепторы. Все более широкое применение начинают находить пептиды в клинической практике. На симпозиуме были

представлены материалы, отражающие две основные линии клинического использования пептидов. Первая из них—исследование изменений содержания пептидов в крови при различных заболеваниях, вторая—лечебное применение пептидов. По данным *Е. М. Стародуба* (Государственный медицинский институт, Тернополь), синтетические пептиды кальцитрин и далаггин оказывают выраженный лечебный эффект при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Обнадеживающие данные были приведены в сообщении *Г. А. Вартамяна, М. В. Неуйминой и А. Н. Чибисова* (НИИ экспериментальной медицины, Ленинград), посвященном участию нейропептидов в лечении центральных двигательных расстройств. Установлено, что при органических повреждениях центральных моторных систем (травма, опухоль, инсульт) в цереброспинальной жидкости проявляется низкомолекулярный пептидный фактор, имеющий отношение к клиническим проявлениям центрального пареза. Позднее в цереброспинальной жидкости появляется другой высокомолекулярный пептидный фактор, комплементарный первому и образующий с ним единый комплекс, который является важным фактором компенсаторно-восстановительных перестроек. Исходя из этого, авторами предложен метод ликворотерапии для лечения остаточных двигательных нарушений центрального генеза. Полученные данные свидетельствуют о выраженном лечебном эффекте, в происхождении которого определенную роль играют компенсаторные перестройки в нейродинамике мозга в виде активации стволовых образований и симметричных структур интактного полушария.

Помимо рассмотренных докладов на симпозиуме был представлен целый ряд интересных сообщений, затрагивающих различные аспекты пептидологии и использования пептидов в клинической практике.

В целом, материалы симпозиума свидетельствуют о возросшем методическом уровне исследований и повышении интереса к клиническим аспектам пептидологии. Намечилось сближение проблемы регуляторных пептидов с фундаментальными проблемами нормальной и патологической физиологии и нейробиологии. Можно ожидать, что концентрация усилий исследователей на наиболее актуальных направлениях пептидологии приведет к дальнейшему углублению представлений о роли регуляторных пептидов в жизнедеятельности организма.

КЛИМОВ К. П., КРУГЛИКОВ Р. И.

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий химических соединений

Ala*—аланин	Lys—лизин
AMP, ADP, ATP**—аденозин-5'-мо-, ди- и трифосфаты	Man—манноза
cAMP—циклический аденозинмонофосфат	Mel—метионин
Ara*—арабиноза	NAD, NADH—никотинамидадениндинуклеотид и его восст. форма
Arg—аргинин	NADP, NADPH—никотинамидадениндинуклеотидфосфат и его восст. форма
Asn—аспарагин	NMN—никотинамидмононуклеотид
Asp—аспарагиновая кислота	Orn—орнитин
Asx—аспарагиновая кислота или аспарагин	Phe—фенилаланин
CAMP, CDP, CTP—цитидин-5'-мо-, ди- и трифосфаты	P _i —неорганический фосфат
CoA—коэнзим A	PP _i —неорганический пиррофосфат
CoASAc—ацетилкоэнзим A	Pro—пролин
Cys—цистеин	Rib, dRib—рибоза, 2-дезоксирибоза
FAD, FADH ₂ —флавадениндинуклеотид и его восст. форма	Q, QH ₂ —убихинон, убихинол
FMN, FMNH ₂ —фламинмононуклеотид и его восст. форма	Ser—серин
Fuc—фукоза	Thr—треонин
Fru—фруктоза	TMP, TDP, TTP—рибозилатинин-5'-мо-, ди- и трифосфаты
Gal—галактоза	Trp—триптофан
Glc—глюкоза	Tyr—тирозин
GlcA—глюкуроновая кислота (аналогично другим уроновым к-ты)	UMP, UDP, UTP—уридин-5'-мо-, ди- и трифосфаты
GlcN—глюкозамин	Val—валин
GlcNAc—ацетилглюкозамин (аналогично другим дезоксисахара и их ацетилпроизводные)	АКТГ—адренокортикотропный гормон
Gln—глутамин	АХ—ацетилхолин
Glu—глутаминовая кислота	ГАМК—гамма-аминомасляная кислота
Glx—глутамин или глутаминовая кислота	ДДС-Na—додецилсульфат натрия
Gly—глицин	ДОФА—диоксифенилаланин
GMP, GDP, GTP—гуанозин-5'-мо-, ди- и трифосфаты	ДНК—дезоксирибонуклеиновая кислота
GSH, GSSG—глутатион и его окисленная форма	ДОХ-Na—дезоксихолат натрия
His—гистидин	РНК—рибонуклеиновая кислота
Hyl—оксализин	pРНК—рибосомная РНК
Hyp—оксипролин	mРНК—матричная (информационная, ядерная) РНК
Ile—изолейцин	tРНК—транспортная РНК
IMP, IDP, ITP—инозин-5'-мо-, ди- и трифосфаты	Glu-tРНК и т. п.—аминоацилпроизводные РНК
Ileu—лейцин	ТХУ—трихлоруксусная кислота
	трис—трис (оксиметил)-аминометан
	ЭГТА—этиленгликольтетраацетат
	ЭДТА—этилендиаминтетраацетат

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

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

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

АХЭ—ацетилхолинэстераза
 БСА—бычий сывороточный альбумин
 ВЭЖХ—высокоэффективная жидкостная хроматография
 ГЖХ—газожидкостная хроматография
 ГЭБ—гематоэнцефалический барьер
 ДЭАЭ-ц—диэтиламиноэтилцеллюлоза
 ИКС—инфракрасная спектроскопия
 ИОХ—ионообменная хроматография
 ИЭТ—изоэлектрическая точка
 ИЭФ—изоэлектрическое фокусирование
 КМ-ц—О-карбоксиметилцеллюлоза
 МАО—моноаминоксидаза
 М. Е.—международная единица
 М—молярность
 M_r —молекулярная масса (вес)
 м-, о-, п.—мета-, орто-, пара-
 н—нормальный (раствор)
 НС—нервная система
 ПААГ—полиакриламидный гель
 ПОЛ—перекисное окисление липидов
 СМЖ—спинномозговая жидкость
 т. кип.—температура кипения
 т. пл.—температура плавления
 ТСХ—тонкослойная хроматография
 У. А.—удельная активность
 УФ-спектр—ультрафиолетовый спектр
 ФДЭ—фосфодиэстераза
 ЦНС—центральная нервная система
 ЭПР—электронный парамагнитный резонанс

ЭСР—электронный спиновый резонанс
 ЯМР—ядерный магнитный резонанс
 А—абсорбция (поглощение)
 г—константа скорости реакции
 K_d —константа диссоциации
 K_i —константа ингибирования
 K_m —константа Михаэлиса
 K_s —субстратная константа
 μ —коэффициент Хилла
 V—максимальная скорость реакции
 Ки—кюри
 мКи—милликюри
 Р—рентген
 имп/мин—импульсы за минуту
 Д—дальтон
 кД—килодальтон
 ч—час
 мин—минута
 с—секунда
 мкм—микрометр
 мл—миллилитр
 мкл—микролитр
 мг—миллиграмм
 мкг—микрограмм
 нг—нанограмм
 нм—нанометр
 пг—пиктограмм
 мкатоm—микроатом
 ммоль—миллимоль
 мкмоль—микромоль
 нмоль—наномоль
 пмоль—пикомоль
 фмоль—фемтомоль

Примечание. Сокращения для названий ферментов, как например, ГДГ, ГДК, ГФБДГ и т. д., не допускаются. Однако нет возражений против замены названия субстрата, входящего в тривиальное наименование фермента, стандартной аббревиатурой, например: АТФазы, РНКазы, NADH дегидрогеназа и т. п. Химические элементы следует обозначать символами, а простые неорганические соединения—формулами, например: $MgCl_2$. Символы ионов следует писать так: Mg^{2+} , Cl^- , PO_3^- .

СО Д Е Р Ж А Н И Е

<i>Дамбинова С. А., Бычов Е. Р., Краснова И. Н., Шевченко К. А., Корольков А. В.</i>	
Влияние комплексной терапии антипаркинсонитами и аутогемоликвора- трансфузии на активность нейромедиаторных систем мозга боль- ных паркинсонизмом	3
<i>Жулин В. В., Плескачева М. Г.</i>	
Связывание ГАМК и диазепама в головном мозгу крыс линии Крушинского-Молодкиной, генетически предраспо- ложенных к аудигенным судорожным припадкам	10
<i>Буданцев А. Ю., Васильчиков В. В.</i>	
Проблемно-ориентированный банк дан- ных «Физико-химические основы межнейрональной коммуникации в мозгу»	18
<i>Арсеньева И. А., Алфеева Л. Ю., Гривенников Н. А.</i>	
Связывание тафетина с плазматическими мембранами мозга крысы и нейробластомы мыши	28
<i>Ролэнсарт Е. В.</i>	
Обратимые ингибиторы холинэстеразы зрительных ганглиев командорского кальмара: силатрановые производные элемент-органи- ческих соединений	38
<i>Якушев В. С., Крисанова И. В.</i>	
Кинетические свойства катепсина Д из боль- ших полушарий головного мозга при перенесенном стрессе	47
<i>Волков Г. Л.</i>	
Физические свойства плазматической мембраны культивируемой клетки нейробластомы C 1300 с измененным липидным составом	55

Краткие сообщения

<i>Головкин А. И.</i>	
Связывание $[^3H]$ ГАМК и $[^{35}S]$ TBPS с синаптическими мем- бранами мозга крыс после судорог, вызванных ГАМК-литиками	64
<i>Маслова Г. Б., Куликов А. В.</i>	
Корреляция между количеством серотониновых рецепторов первого типа в головном мозгу и агрессивным поведением крыс	68
<i>Сергутина А. В., Герштейн Л. М.</i>	
Временная динамика аминопептидазной ак- тивности—показатель адаптационных процессов в ЦНС	72
<i>Бережной Г. А., Лисяний Н. И., Белик Я. В., Черненко Т. М., Лихмус Е. Ю., Комиссаренко С. В., Тухтаев Н. Х., Арустамян Р. С.</i>	
Содержание неко- торых нейроспецифических белков в крови больных с черепно-мозговой травмой	76

Обзоры

<i>Розанов В. А., Шафран Л. М.</i>	
Основные проявления и механизмы нейроток- сичности оловоорганических соединений	81

Письма в редакцию

<i>Александрян А. Р.</i>	
Влияние гипоталамического фактора на сократительную спо- собность гладкой мускулатуры горты	94

Хроника

<i>К 80-летию Н. Н. Демьяна</i>	97
<i>Жданов П. К., Кругликов Р. И.</i>	
Всероссийный симпозиум «Физиологическое и клиническое значение регуляторных пептидов	99

CONTENTS

<i>Dambinova S. A., Bychkov E. R., Krasnaya I. N., Shchchenko K. A., Korolkov A. V.</i> The influence of complex therapy by antiparkinsonian drugs and the autohaemoliquorotransfusion on the activity of neurotransmitter systems in the brains of patients with parkinson's disease	3
<i>Zhulin V. V., Pleskacheva M. G.</i> GABA- and benzodiazepine receptors in the brain of Krushinsky-Molodkina rats genetically prone to audiogenic seizures	10
<i>Budantsev A. Yu., Vasilchikov V. V.</i> Specialized data bank "Physical and chemical basic of interneuronal communication in brain (PCBIC-91)"	18
<i>Arefyeva I. A., Alfeeva L. Yu., Grivennikov I. A.</i> Tuftsin binding to rat brain plasmatic membranes, rat glioma and murine neuroblastoma cell lines	28
<i>Rozengart E. V., Kovalev N. N., Fedoretz Yu. A., Shestakova N. N., Epshtain L. M., Khozanskikh A. E.</i> Reversible inhibitors of commodore squid optical ganglia cholinesterase: silatram derivatives of klementorganic compounds	38
<i>Yakushev B. S., Krisanova N. V.</i> Kinetic properties of cathepsin D from cerebral hemispheres of rats after emotional stress	47
<i>Volkov G. L.</i> Physical properties of plasma membrane of cultivated neuroblastoma C 1300 cell with modified lipid composition	55

Short communications

<i>Golovko A. I.</i> The binding of [^3H] GABA and [^{35}S] γ -BPS with rat brain synaptosomal membranes after GABA antagonists-induced seizures	64
<i>Mastova G. B., Kulikov A. V.</i> Correlation between serotonin ₁ receptor concentration in brain and intermale aggressive behavior of mice	68
<i>Sergutina A. V., Gershtein L. M.</i> Time-dependent changes in aminopeptidase activity as a marker of adaptive processes in CNS	72
<i>Berezhnoi G. A., Lisyani N. I., Belik Ya. V., Cheren'ko T. M., Lykhmus E. Yu., Komissarenko S. V., Tukhtayev N. Kh., Arustamyan R. S.</i> The level of some neurospecific proteins in blood of patients after cerebral trauma	76

Reviews

<i>Rosanov V. A., Shafran L. M.</i> The main manifestation and mechanisms of neurotoxicity of the tin-organic compounds	81
---	----

Letters to Editor

<i>Aleksanian A. R.</i> Influence of hypothalamic factor on aorta smooth muscle	94
---	----

Chronicles

In commemoration of the 80th anniversary of N. N. Doemin	92
<i>Klimov P. K., Kruglikov R. I.</i> All-Union Symposium "Physiological and clinical meaning of regulatory peptides"	99