

т. 10, № 3-4, 1991

ISSN 0203-393X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 10, ВЫП. 3—4
АПРЕЛЬ—ИЮНЬ
ИЮЛЬ—ДЕКАБРЬ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЕНИИ
ЕРЕВАН 1991

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

Сдано в набор 17. 12. 1991 г. Подписано к печати 11. 11. 1992 г.
Формат 70×108¹/₁₆. Бумага № 1 «сыктывкарская». Высокая печать.
Печ. лист. 9,88. Усл.-печ. лист. 13,83. Усл. кр. от 13,83. Учет.-изд. 11,9.
Тираж 520. Заказ 318. Издат. 8016. 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. ГАЛЮЯН—главный редактор

А. ЛАЙТА (США)—соредактор

**Н. Ф. АВРОВА, Г. В. АПРИКЯН, Н. Г. АЛЕКСИДЗЕ, А. В. АРУТЮНЯН,
И. П. ДШМАРИН, Н. А. БАРХУДАРЯН (отв. секретарь), Р. Н. ГЛЕБОВ,
К. Г. КАРАГЕЗЯН (зам. главного редактора), Д. Г. МИКЕЛАДЗЕ,
В. С. ОГАНЕСЯН, А. Т. ПИКУЛЕВ, К. С. РАЕВСКИЙ, Г. С. ХАЧАТРЯН,
Б. АГРАНОВ (США), С. ТУЧЕК (Чехо-Словакия)**

Редакционный совет

**М. И. АГАДЖАНОВ, А. Ю. БУДАНЦЕВ, В. А. БЕРЕЗН, М. А. ДАВТЯН,
С. А. ДАМБИНОВА, Н. Н. ДЕМИН, Н. Д. ЕЩЕНКО, Б. Н. МАНУХИН,
Н. К. ПОПОВА, В. И. РОЗЕНГАРТ, Е. С. СЕВЕРИН, В. П. СКУЛАЧЕВ,
Л. Я. ТЯХЕПЫЛД, С. Х. ХАЙДАРЛИУ, Е. М. ХВАТОВА, Р. Н. ЭТИНГОФ**

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

Журнал «НЕЙРОХИМИЯ» (орган АН СССР и АН Армении) основан в 1982 г. В нем публикуются статьи по актуальным вопросам функциональной нейрохимии, касающимся структуры и биологической роли специфических белков, нейропептидов, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, липидов и других соединений нервной ткани, биохимии трансмиттеров и их рецепторов, глии и нейронов, хромофинных гра- нул 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 612.822.1:577.175.823;615.212.7:547.95

**НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ
ИЗМЕНЕНИЯ ПОД ВЛИЯНИЕМ ТАФТСИНА В УСЛОВИЯХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭПИЛЕПСИИ**ГЕРШТЕЙН Л. М., ДОВЕДОВА Е. Л., ПОПОВА Н. С., *ВЕСКОВ Р.,
*СТОИЛКОВИЧ М., *ПЕКОВИЧ С., *СТУКАЛОВ П.

НИИ мозга АМН СССР, Москва

*Клинический Центр САН, Белград

В данной работе с целью выяснения особенностей взаимодействия структур мозга на системном, клеточном и субклеточном уровнях в условиях созданной экспериментальной модели—эпилепсии, а также выяснения возможности корреляции ее проявлений под действием тетрапептида тафтсина был проведен сравнительный анализ поведения животных, биоэлектрической активности структур мозга и биохимических показателей в тех же образованиях до и после введения данного пептида на фоне или до появления признаков пенициллиновой эпилепсии.

Современная, в основном отечественная, нейробиология накопила весьма разнообразные данные по действию тетрапептида тафтсина (Thr-Lys-Pro-Arg) на организм. Такие данные в основном касаются либо его влияния на поведение животных, либо на отдельные показатели нейрохимических процессов в структурах мозга. Так, известно, что тафтсин стимулирует неспецифический иммунитет, влияет на двигательную активность животных, оказывает стресспротективное и антидепрессантное действие [1—4].

Механизм действия тафтсина на ЦНС еще не выяснен. Немногочисленные данные свидетельствуют о том, что эффект этого препарата опосредуется воздействием на катехоламинергические системы. Так, установлено его влияние на активность тирозингидроксилазы, в частности в гипоталамусе и стриатуме [5].

Для решения вопроса о целесообразности использования тафтсина в клинических условиях необходимо представить его действие не только на intactных животных, но и в условиях экспериментальной патологии. Применяя широко используемую модель эпилепсии, мы пытались изучить действие тафтсина в условиях хорошо выраженной на электроэнцефалограмме (ЭЭГ) эпилептиформной активности и двигательной гиперактивности в условиях миоклонических судорог. Известно, что в механизмах пенициллиновой эпилепсии активную роль играет система глутаминовой кислоты—ГАМК, что не исключает возможности изменения и других нейромедиаторных систем (либо вторично, либо опосредованно).

В настоящем комплексном исследовании в условиях экспериментальной эпилепсии ставилась задача выяснить действие тафтенина на нейрохимические, электрофизиологические показатели в различных структурах мозга при контроле за поведением животных (крысы, кошки).

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах и кошках с вживленными электродами во все области коры и хвостатого ядра. Животные были объединены в группы по сериям эксперимента: I группа—контрольные животные (беспородные крысы массой 250—300 г, кошки массой 3,0—3,5 кг); II группа—экспериментальные животные, подвергнутые фармакологическому воздействию: однократное внутримышечное введение пенициллина (кристаллический препарат калий-бензилпенициллин, «Galenika», СФРЮ), доза 400 000 Е/кг массы тела кошки, 100 000 Е/кг—для крысы.

Во всех случаях развитие эпилептической активности наблюдали в течение 1—1,5 ч. III группа—экспериментальные животные, которым вводили тафтенин внутривентриально в дозе 0,3 мг/кг через 45 мин после введения пенициллина, IV группа—экспериментальные животные, которым вводили тетрапептид тафтенин за 30 мин до действия пенициллина.

Введение тафтенина до появления эпилептиформной активности либо на фоне ее полного развития производили под постоянным контролем ЭЭГ каждой из структур мозга. Эффекты пептида прослеживали в течение 30 мин, после чего животных декапитировали и мозг использовали для биохимических и морфологических исследований.

Для биохимического исследования служили субфракции «легких» и «тяжелых» синапсом (С и Д) и свободных митохондрий нейронов (Е), выделенные в градиенте плотности сахарозы 0,8—1,4 М [6], а также срезы сенсомоторной коры и хвостатого ядра. В указанных образованиях мозга спектрофотометрически определяли содержание белка по Lowry [7], активность молекулярных форм МАО типа А при 250 нм (субстрат—серотонин) по методу Горкина [8] и типа В при 450 нм (субстрат—пара-нитрофенилэтиламин) по методу Попова [9].

Для гистохимического исследования мозг фиксировали в жидкости Карнуа и после гистологической проводки заключали в парафиновые блоки. Методом интерферометрии на микроскопе «Интерфако» (ГДР) в нейронах слоев III и V сенсомоторной коры и нейронах хвостатого ядра определяли сухую массу плотных веществ (при 535 нм), которые на фиксированном материале отражают содержание структурированных белков [10].

Одновременно измеряли площадь профильного поля цитоплазмы и ядер нейронов с помощью окуляр-микрометра МОВ—1—15. Морфологический контроль осуществляли на срезах, окрашенных крезил-виолетом [11].

Введение пенициллина животным через 30—45 мин вызывало на ЭЭГ эпилептиформные циклические разряды, регистрирующиеся одновременно во всех исследованных структурах мозга как у кошек, так и у крыс. Эпилептиформные разряды у всех животных сопровождались многоклоническими сокращениями мышц шеи и мордочки.

Результаты и обсуждение

Не останавливаясь на подробном описании самих эпилептиформных разрядов в структурах мозга, обусловленных введением пенициллина, напомним, что их частота, длительность, амплитуда во многом зависят от функционального состояния животных [12, 13].

В наших экспериментах у бодрствующих животных (кошки, крысы) эпилептиформные циклические разряды имели длительность от 1 до 1,5 с, следовали с интервалом 8—25 с и проявлялись на протяжении 4 ч и более (рис. 1, а). После этого у большинства животных они переходили в генерализованные эпилептические приступы, которые могли привести к гибели животных. До появления генерализованных приступов разряды сопровождались многоклоническими сокращениями мышц шеи и мордочки животных. Наблюдалась коррекция между эпилептиформной активностью и многоклоническими сокращениями мышц.

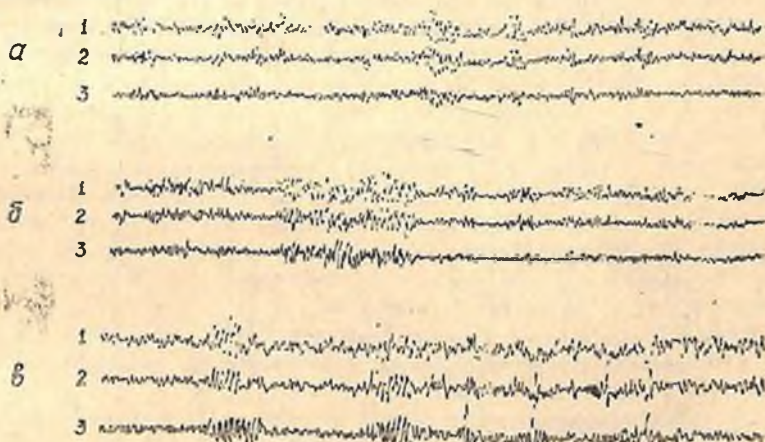


Рис. 1. Электроэнцефалограмма различных областей коры больших полушарий мозга крыс. 1—зрительная кора (левая), 2—зрительная кора (правая), 3—сенсомоторная кора (правая); а—эпилепсия, б—тафтики на фоне эпилепсии, в—тафтики до развития эпилептиформной активности

При биохимическом определении активности У.А. МАО типов А и В сенсомоторной области коры и хвостатого ядра мозга крыс на субклеточном уровне в условиях опытов, описанных выше, было обнаружено, что экспериментальная эпилепсия по сравнению с нормой практически не изменяла ферментной активности (рис. 2).

Под влиянием пенициллина происходило также уменьшение размеров цитоплазмы и ядер нейронов, сопровождающееся снижением содержания и концентрации белков, что позволяет предполагать преобладание процессов распада белка над его синтезом (табл. 1).

Введение тафтсина на фоне развившихся эпилептиформных разрядов у кошек и крыс приводило (через 25—30 мин) к их учащению,

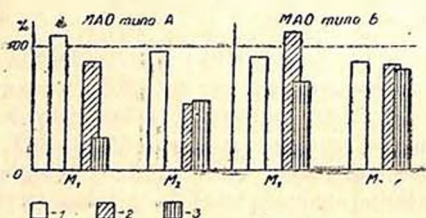


Рис. 2. Изменение величины У. А. MAO типа А и Б во фракциях митохондрий сенсомоторной коры (M_1) и хвостатого ядра (M_2) мозга крыс под влиянием тафтсина и условиях экспериментальной эпилепсии (%). 1—эпилепсия, 2—тафтсин до развития эпилептиформной активности, 3—тафтсин на фоне эпилепсии

интервалы между разрядами укорачивались до 4—10 с, сами разряды удлинялись во времени до 2,5 с, захватывая, как и прежде, все структуры мозга (рис. 1, б). В этих условиях эффект тетрапептида тафтсина приводил к снижению величины У. А. MAO типа А во фракциях митохондрий (М) обоих образований мозга по сравнению с нормой. Это подавление было выражено более в сенсомоторной коре (M_1) для активности MAO А (рис. 2). По биохимическим показателям введение тафтсина на фоне развившейся эпилептической активности стабилизировало выраженные изменения при пенициллине, в некоторых случаях появлялась тенденция к их уменьшению.

Введение тафтсина до появления эпилептиформной активности приводило к некоторому удлинению латентного периода появления первых разрядов (45 мин—1 ч), однако, после того как возникали эпилептиформные разряды, они становились несколько более длительными и следовали более часто, то есть эффект совпадал с тем, который наблюдался при введении тафтсина на фоне развившейся эпилептиформной активности (рис. 1, в).

Вместе с тем, после введения тафтсина даже через 4—5 ч больших губительных генерализованных эпилептических приступов не наступало ни у крыс, ни у кошек.

По биохимическим показателям при использовании тафтсина до развития эпилепсии обнаружен некоторый стабилизирующий эффект пептида, особенно в субфракциях коры мозга крыс; в мозгу кошек, как при действии пенициллина, так и при действии тафтсина, введенного до или на фоне пенициллина, обнаружено подавление ферментной активности MAO типа А (рис. 3).

В этих условиях тафтсин не оказывал влияния, а в некоторых случаях усугублял имеющиеся структурные изменения в цитоплазме (размеры, содержание и концентрация белка). При этом ядра нейронов увеличивались в размерах; имеющиеся литературные данные

Таблица 1

Изменение морфохимических показателей в нейронах сенсомоторной коры в норме
и при экспериментальных воздействиях

Слой III				Слой V			
Контроль	Пенициллин	Пенициллин + тафтсин	Тафтсин + пенициллин	Контроль	Пенициллин	Пенициллин + тафтсин	Тафтсин + пенициллин
Площадь цитоплазмы (мкм ²)							
70,15±1,14 100%	61,85±1,35 87%	62,55±1,00 88,5%	59,11±1,13 84,2%	168,87±3,88 100%	162,70±3,31 96,4%	154,69±4,69 91,7%	155,00±2,57 91,7%
Площадь ядра (мкм ²)							
54,07±0,85 100%	45,08±0,83 83,3%	54,14±0,79 100%	72,14±1,17 133,3%	92,75±2,45 100%	96,49±1,93 104,3%	95,23±2,08 102,1%	117,60±2,13 126,8%
Сухой вес цитоплазмы (нг)							
82,17±2,16 100%	68,53±1,87 82,9%	69,6±2,65 85,3%	65,84±1,64 80,4%	217,41±5,14 100%	192,3±1,9 88,4%	180,05±5,25 82,9%	183,13±4,56 84,3%
Концентрация белка в цитоплазме (нг/мкм ³)							
1,18±0,01 100%	1,15±0,016 97,5%	1,09±0,008 92,3%	1,14±0,017 96,6%	1,25±0,01 100%	1,17±0,014 93,6%	1,20±0,01 96,0%	1,210±0,018 96,8%

и полученные нами ранее [14, 15] свидетельствуют об активации обменных процессов в ядрах.

Указанные цитохимические изменения наиболее выражены в хвостатом ядре и в слое III сенсомоторной коры.

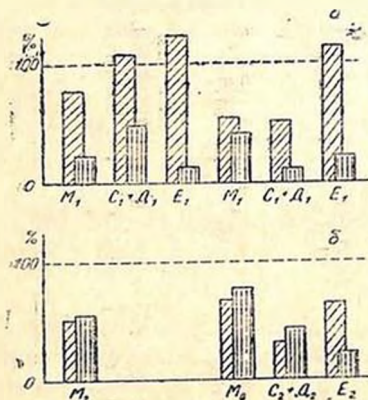


Рис. 3. Изменение величины У.А. МЛО типа А в субфракциях синапсом С+Д и митохондрий Е сенсомоторной коры (M_1) и хвостатого ядра (M_2) мозга крысы (а) и кошки (б). Уровень активности при эпилепсии принят за 100%. Остальные обозначения как на рис. 2.

В заключение можно сделать вывод, что эпилептиформная активность, вызванная большими дозами пенициллина, сопровождается определенными нейрохимическими и морфологическими изменениями

Таблица 2

Изменение морфохимических показателей в нейронах хвостатого ядра мозга крысы в норме и при экспериментальных воздействиях

Хвостатое ядро			
Контроль	Пенициллин	Пенициллин + тафтин	Тафтин + пенициллин
Площадь цитоплазмы (мкм ²)			
59,34±0,82 100%	45,5±0,72 76,2%	41,27±0,64 69,5%	38,27±0,77 64,4%
Площадь ядра (мкм ²)			
46,5±0,77 100%	40,49±0,53 86,9%	47,26±0,68 102,1%	54,12±0,67 117,3%
Сухой вес цитоплазмы (нг)			
74,10±1,34 100%	52,10±1,54 70,2%	46,38±1,09 62,1%	41,24±1,01 59,4%
Концентрация белка в цитоплазме (нг/мкм ²)			
1,26±0,02 100%	1,14±0,01 90,4%	1,15±0,02 91,2%	1,150±0,008 91,2%

мозга. А именно, наблюдается уменьшение размеров ядра и цитоплазмы нейронов слоев III и V, сенсомоторной коры и хвостатого ядра, а также содержания и концентрации в них белков. При этом

отмечается полная морфологическая сохранность отдельных компонентов нейрона (тигроидное вещество, хроматиновые структуры ядра).

Из ранее полученных данных видно, что внутрибрюшинное введение пенициллина кошкам через 60 мин приводит к реципрокным изменениям ферментной активности МАО: снижению МАО А и парастазию МАО В [13]. У крыс эти изменения не обнаружены, ферментная активность сохраняется на обычном уровне, что свидетельствует о большей устойчивости этих животных к экспериментальному воздействию.

Действие тафтсина на так называемую пенициллиновую эпилепсию показало, что эффект пептида имеет место и проявляется в большей мере при его введении до начала появления эпилептиформной активности у животных. Введение тафтсина до развития эпилептиформной активности оказывает превентивный эффект, что особенно проявляется в субклеточных структурах коры больших полушарий. Первичным в эффекте тафтсина, по некоторым литературным, а также нашим данным, является активация ДА-ергической системы.

Сравнивая цитохимические показатели, также можно сделать вывод о том, что выявленные изменения после введения тафтсина как бы стабилизируются или имеют тенденцию к усилению.

На системном уровне превентивный эффект сочетается с удлинением латентного периода проявления эпилептиформной активности, отсутствием губительных эпилептических припадков, а также с тем, что фокальные разряды не переходят в генерализованные.

На основании проведенного нами комплексного исследования не представляется возможным использовать тетрапептид тафтсин в качестве седативного препарата при эпилепсии. Однако для окончательного решения этого вопроса целесообразно исследовать более длительное воздействие тафтсина в условиях данной экспериментальной патологии.

NEUROCHEMICAL AND NEUROPHYSIOLOGICAL CHANGES IN THE BRAIN INDUCED BY TETRAPEPTIDE TUFTSIN IN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL EPILEPSY

GERSHTEIN L. M., DOVEDOVA E. L., POPOVA N. C., VESKOV R.,
STOILCOVICH M., PETOVICH S., STUKALOV P.

Brain Research Institute of the USSR Academy of Medical Science, Moscow
Clinical center, SAS, Belgrad

The aim of the work was to study the peculiarities of brain structure interactions in conditions of experimental epilepsy on systemic, cellular and subcellular level and to evaluate the possibility to correct its manifestations by means of tetrapeptide tuftsine. For this purpose a comparative analysis of animals behaviour, bioelectric activity of brain structures and some biochemical parameters in the same brain structures before and after tuftsine injection to epileptic and healthy animals was performed.

1. Андреев С. О., Анохин К. В., Антонова Л. В. и др. Докл. АН СССР, т. 253, № 2, с. 498—500, 1980.
2. Вальдман А. В., Бондаренко Н. А., Козловская М. М., Минеева М. Ф., Анохин К. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 94, № 4, с. 49—52, 1982.
3. Вальдман А. В., Козловская М. М.—В кн.: Физиологически активные пептиды, Пушкино, с. 51—68, 1988.
4. Сарычева Н. Ю., Калихевич В. И., Каменский А. А., Власова Т. И. Бюл. науки, № 3, с. 70—75, 1989.
5. Вальдман А. В., Козловская М. М., Ашмарин И. П., Минеева М. Ф., Анохин К. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 92, № 7, с. 31—33, 1981.
6. Robertis de E., Pellegrino de Iardi A., Rodrigues de Lopes Arnais R., Salignicoff I. J. J. Neurochem, v. 9, p. 23—25, 1962.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randa! R. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—269, 1951.
8. Горкин В. З., Вережкина И. В., Гряднева Л. И., Жердева Л. В., Кляшторин Л. Б., Кривченко Р. С., Комиссарова Н. В., Леонтьева Г. А., Романова Л. А., Северина И. С., Фейгина С. М.—В кн.: Современные методы в биохимии, т. 2, с. 155—161, М., 1968.
9. Popov V., Rostler V., Thiemann C., Matties H. Acta biol. med. Germ., Bd 26, S. 139—245, 1971.
10. Бродский В. Я.—В кн.: Трофика клетки, М., 1966.
11. Викторов И. В.—В кн.: Современные методы морфологических исследований, с. 7—10, М., 1969.
12. Адрианов О. С., Доведова Е. Л., Весков Р., Ракич Л., Врбанова Л., Панушева Н. Материалы трудов I съезда психиатров соц. стран, с. 162—168, М., 1987.
13. Попова Н. С., Адрианов О. С., Весков Р., Янкович И. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 108, № 8, с. 175—180, 1989.
14. Казакова Н. Л., Нездина Н. Н. Нейрофизиология, т. 4, № 1, с. 41—46, 1972.
15. Пигарева З. Д., Буснюк М. М., Герштейн Л. М., Доведова Е. Л., Узбеков М. Г.—В кн.: Развивающийся мозг и среда, с. 142—192, М., Наука, 1980.
16. Доведова Е. Л. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 102, № 8, с. 155—157, 1986.
17. Доведова Е. Л., Качалова Л. М., Орлова Е. И. Невропатология и психиатрия, т. 86, № 7, с. 1025—1028, 1986.

Поступила 25. X. 1990

УДК 612.822.3.577:12.38

УЧАСТИЕ NAD В ПРОЦЕССАХ СИНАПТОСОМНОГО ВЫСВОБОЖДЕНИЯ И СВЯЗЫВАНИЯ ГАМК В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС

ТОВМАСЯН Е. К., АНТОНЯН А. А., КОЧАРЯН М. Г., *РОЗАНОВ В. А.,
*ГЕРАСИМЯК Г. Р., АРУТЮНЯН А. В.

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

*Институт гигиены подного транспорта, Одесса

Изучено влияние NAD на процессы спонтанного и K^+ -стимулируемого высвобождения ГАМК синапсом, а также связывание ее синаптическими мембранами головного мозга крыс. Показано, что NAD в концентрации 0,1 мМ активирует спонтанное высвобождение [НС]ГАМК. Вместе с тем, NAD оказывает выраженный ингибирующий эффект на специфическое связывание [3H]ГАМК в диапазоне ее концентраций 8—10 нМ. Ингибирование носит неконкурентный характер. Полученные результаты, наряду с ранее опубликованными данными об ингибировании высокоаффинного захвата ГАМК под влиянием NAD, свидетельствуют, о его участии в процессах пре- и постсинаптической регуляции ГАМКергической системы в ЦНС.

В настоящее время внимание исследователей широко привлекает изучение некоферментных функций NAD. К ним относится, в первую очередь, участие NAD в посттрансляционной модификации белков путем ADP-рибозилирования и вызванное этим изменение матричной активности хроматина, дифференциации и трансформации клеток [1, 2]. Важным аспектом исследования некоферментной роли NAD в нервной ткани является его участие в модуляции синаптических процессов.

Известно, что NAD и его предшественники—никотинамид и никотиновая кислота используются при лечении шизофрении, эпилепсии и психозов различной этиологии. Как полагают некоторые авторы, благоприятный терапевтический эффект этих соединений обусловлен их взаимодействием со специфическими структурами синаптических мембран, что приводит к реализации еще окончательно не распознанной последовательности функциональных ответов возбудимых клеток [3]. Установлено, что синаптические мембраны содержат два участка связывания, отличающихся высоким и низким сродством к NAD [4]. Высказывается мнение, что NAD, как и аденозин, выполняющий функции нейромедиатора и нейромодулятора в ЦНС [5, 6], угнетает нейрональную активность, возможно, путем подавления процесса высвобождения возбуждающих нейромедиаторов [6, 7].

Ранее в нашей лаборатории был показан ингибирующий эффект физиологических концентраций NAD на высокоаффинный захват ГАМК синапсосомами головного мозга крыс [8]. Для более полного представления о нейромодуляторной функции NAD нами было принято изучение его действия на процессы синаптического высвобождения, а также связывания ГАМК.

Материалы и методы

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах массой 180—200 г. Синапсосомы выделяли из коры головного мозга крыс по методу Hajos [9]. Чистоту и морфологическую целостность выделенных синапсосом контролировали электронно-микроскопическим путем. Полученный осадок синапсосом суспендировали в 0,32 М растворе сахарозы и определяли высвобождение меченого лиганда, как было описано ранее [4]. Суть метода заключалась в предварительном обогащении синапсосом меченой [^{14}C]ГАМК, после чего синапсосомы выдерживали в инкубационной среде, содержащей NAD, аденозин (по 0,1 мМ) или KCl в деполяризующих концентрациях. Остаточное накопление [^{14}C]ГАМК оценивали после быстрого центрифугирования проб (16000 g, 10 мин, 4°). Связывание меченой ГАМК определяли во фракции синаптических мембран, выделенных по методу Abita и соавт. [10]. Инкубационная смесь содержала 50 мМ трис-HCl буфера, pH 7,4, [^3H]ГАМК («Amersham», Англия) от 2 до 12 нМ, синаптические мембраны (100 мкг) и эффектор. Неспецифическое связывание определяли при наличии в инкубационной среде 1 мМ немеченой ГАМК. Пробы инкубировали в течение 30 мин при 0—4°. Реакцию останавливали быстрой фильтрацией проб под вакуумом через целлюлозные фильтры диаметром проб 0,3 мм («Synprot», Чехословакия). Осажденные на фильтрах синаптические мембраны промывали 5-кратным объемом буфера. Радиоактивность измеряли в толуольном сцинтилляторе на счетчике «Intertechnique» (Франция). Специфическое связывание определяли путем вычитания значений неспецифического связывания из общего. Белок определяли по методу Lowry и соавт. [11].

Результаты и обсуждение

Нами обнаружено, что при применении NAD в концентрациях 10^{-6} — 10^{-5} М, ингибирующий обратный захват ГАМК [8], он не оказывает существенного влияния на процесс ее спонтанного высвобождения синапсосомами коры головного мозга крыс. С повышением концентрации отмечается активирующий эффект, достигающий максимума при добавлении к синапсосомной фракции 10^{-4} М (стимулирование высвобождения [^{14}C]ГАМК на 38%). Аналогичное, еще более выраженное действие на этот процесс оказывает аденозин в эквимоларных NAD концентрациях (рис. 1). Исходя из полученных резуль-

татов можно предположить, что как NAD, так и аденозин, эффективность которых проявляется при применении достаточно высоких концентраций, выступают в данном случае в качестве агентов, индуцирующих деполяризацию мембраны синапсом и выброс ГАМК в синаптическую щель. Аналогичные данные в отношении стимулирующего влияния высоких концентраций NAD (10^{-3} M) были получены ранее Халмуратовым и соавт. в отношении высвобождения других нейромедиаторов, в частности серотонина и дофамина [4]. При изучении захвата [14 C]ГАМК синапсом головного мозга крыс было

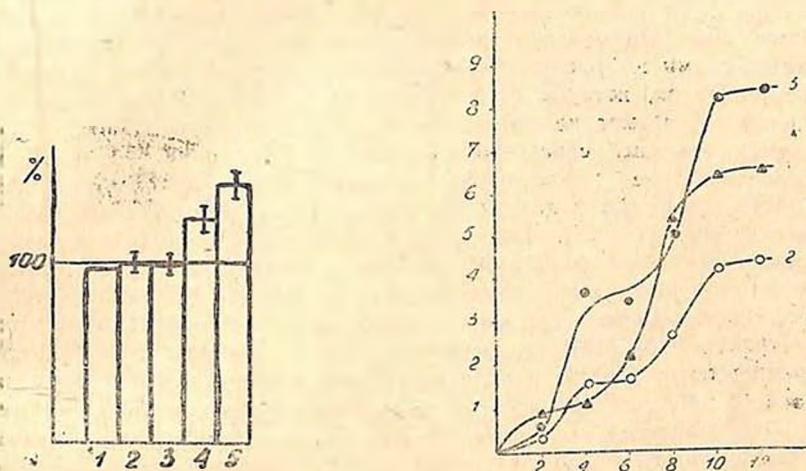


Рис. 1. Влияние NAD и аденозина на высвобождение [14 C]ГАМК из синапсом головного мозга крыс. 1—контроль, 2—NAD (10^{-6} M), 3—NAD (10^{-5} M), 4—NAD (10^{-4} M), 5—аденозин (10^{-4} M).

Рис. 2. Связывание [3 H]ГАМК с синаптическими мембранами головного мозга крыс. 1—контроль, 2—NAD (10^{-4} M), 3—аденозин (10^{-4} M). По оси абсцисс—концентрация [3 H]ГАМК (нМ), по оси ординат—связывание [3 H]ГАМК (фмоль/мг·мин)

показано, что ингибирующий эффект NAD не связан с образованием продуктов его метаболизма [8]. В связи с этим нами было исследовано высвобождение [14 C]ГАМК под влиянием NAD в присутствии никотинамида (10 мМ), ингибирующего NAD-азу, являющуюся единственным ферментом, ответственным за синапсомный распад NAD. Согласно полученным ранее в нашей лаборатории данным [13], активность NAD-азы во фракции синапсом, используемой нами для изучения влияния NAD на процессы захвата и высвобождения ГАМК, составляет всего 26,6 нмоль/мг белка·мин и ингибируется в присутствии 10 нМ никотинамида на 80%. Сам никотинамид в этой концентрации не оказывает существенного действия на стимулирующий эффект NAD в отношении высвобождения [3 H]ГАМК (данные не представлены). Известно, что высвобождение ГАМК, в основном,

осуществляется пресинаптическими нервными окончаниями. После высвобождения она подвергается обратному захвату клетками нейронов и глии при участии высокоаффинных Na^+ -зависимых транспортных систем [12]. Полученные нами результаты, наряду с опубликованными ранее данными о влиянии NAD на процесс высокоаффинного захвата ГАМК синапсосомами, свидетельствуют об участии никотинамидадениндинуклеотида в пресинаптической регуляции ГАМК-ергической системы.

В следующей серии опытов была предпринята попытка изучить влияние NAD на процесс постсинаптической рецепции ГАМК. С этой целью было исследовано специфическое связывание [^3H]ГАМК синаптическими мембранами головного мозга крыс. В первом варианте экспериментов, которые носили ориентировочный характер, было исследовано связывание возрастающих концентраций [^3H]ГАМК (2—12 нМ) фракцией синаптических мембран. Как видно из рис. 2, в этом диапазоне концентраций выявляются две системы рецепции ГАМК—с высоким и низким сродством, что соответствует литературным данным [14, 15]. Добавление в среду инкубации NAD и аденозина в концентрации 10^{-4} М, которая оказывает максимальный эффект на процесс высвобождения меченой ГАМК, приводит к отчетливым изменениям ее связывания. В диапазоне минимальных концентраций [^3H]ГАМК (до 2 нМ) оба соединения слегка ингибируют процесс связывания, при повышении концентрации меченого лиганда до 4—6 нМ аденозин значительно активирует его, в то время как NAD практически не оказывает эффекта. При дальнейшем увеличении концентрации [^3H]ГАМК (10—12 нМ) аденозин стимулирует ее специфическое связывание, тогда как NAD в значительной мере подавляет. Этот эффект NAD, выявляемый в зоне насыщения низкоаффинной системы связывания, представляет значительный интерес и нуждается в дополнительном изучении. Данные о влиянии пуринов и их производных на Na^+ -независимое связывание [^3H]ГАМК синаптическими мембранами мозга крыс несут противоречивый характер. Показано, в частности, что аденозин, наряду с другими пуринами (инозин, дезоксаденозин, гипоксантин), ингибируют этот процесс, аденозинфосфаты—сАМР и АТР не влияют на него [16]. По нашим данным, аденозин и NAD, в зависимости от концентрации [^3H]ГАМК, оказывают разнонаправленное действие на его рецепторное связывание синаптическими мембранами мозга. Представляется вероятным, что оба соединения связываются на одних и тех же участках постсинаптического ГАМК-рецептора, на что указывает симметричный характер полученных в их присутствии кривых связывания [^3H]ГАМК.

Дальнейшие исследования преследовали цель детализировать феномен влияния NAD на связывание ГАМК, оценить его кинетические параметры и выявить концентрационную зависимость этого эффекта. Для этого была выбрана рабочая концентрация [^3H]ГАМК 6 нМ, находящаяся на линейном участке кривой зависимости связывания ГАМК от ее концентрации (рис. 2). В данном случае мембраны под-

вергали двукратному переосаждению в бидистиллированной воде с последующим ресуспендированием в 50 мМ трис-НСl буфере, рН 7,4. Эта процедура, согласно данным литературы, способствует освобождению от эндогенных ингибиторов связывания [17, 18], что дает возможность повысить чувствительность метода. Как ожидалось, в этих условиях были получены более высокие значения связывания (примерно в 5 раз), при этом характер концентрационной зависимости

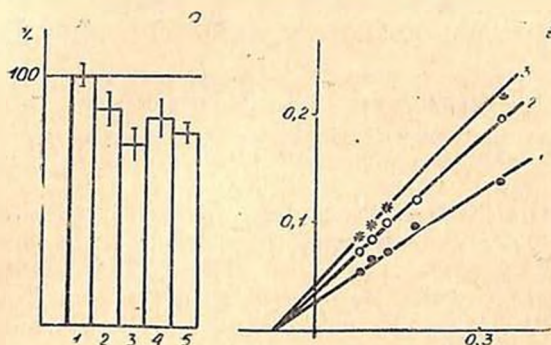


Рис 3. Влияние NAD на специфическое связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ с синантическими мембранами головного мозга крыс: а—действие различных концентраций NAD на специфическое связывание $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ (6 нМ). 1—контроль, 2—NAD— 10^{-6} М, 3—NAD— 10^{-5} М, 4—NAD— 10^{-4} М, 5—NAD— 10^{-3} М; б—кинетика ингибирования связывания $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ в обратных координатах Лайнуивера-Берка: 1—контроль, 2—NAD 10^{-5} М, 3—NAD— 10^{-4} М.

в диапазоне 3—10 нМ $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ остался прежним. В соответствии с целями эксперимента вначале было проверено влияние возрастающих концентраций NAD (10^{-5} — 10^{-3} М) на связывание 6 нМ ГАМК. Как видно из представленных данных (рис. 3, а), ингибирующий эффект NAD в этих условиях проявлялся, начиная с концентрации 10^{-5} М, и при дальнейшем увеличении мало изменялся. Исследование кинетики ингибирования под влиянием NAD связывания ГАМК показало его неконкурентный характер (рис. 3, б). Как было установлено, NAD, не меняя сродства рецепторов к лиганду (K_d 14,3 нМ), снижает максимальную скорость процесса связывания. Примечательно, что эффект NAD наблюдается в области физиологических концентраций. Возможно, NAD, являясь эндогенным лигандом бензодиазепиновых рецепторов [19], функционально сопряженных с ГАМК-рецептором, оказывает косвенное влияние на сродство ГАМК к рецепторным участкам.

Представленные в данном сообщении данные, наряду с опубликованными ранее результатами [8], свидетельствуют о роли NAD в ГАМК-ергической передаче. Можно думать, что NAD, неконкурентным образом ингибируя связывание ГАМК, ограничивает возмож-

ности реализации его медиаторного эффекта. Наряду с этим, путем активации процесса высвобождения и ингибирования обратного захвата ГАМК, NAD может создавать условия для ее избыточного накопления в синаптической щели, что, в свою очередь, способствует метаболическим превращениям ГАМК в нервной ткани [20].

THE PARTICIPATION OF NAD IN THE PROCESSES OF GABA SYNAPTOSOMAL RELEASE AND BINDING IN RAT BRAIN

TOVMASIAN E. K., ANTONIAN A. A., KOCHARIAN M. G., *ROSANOV V. A.,
*GERASIMYAK G. R., ARUTUNIAN A. V.

G. Ch. Buniatian Institute of Biochemistry, Armenian Acad. Sci., Yerevan
*All-Union Institute of water transport, Odessa

The effect of NAD on the processes of spontaneous and K^+ -stimulated release of GABA in synaptosomes, as well, as its binding by rat brain synaptic membranes has been studied. The activation of [^{14}C] GABA spontaneous release by 0,1 mM NAD is shown. Besides in the ranges of 8—10 nM concentrations NAD exerts the pronounced inhibitory effect upon the [3H] GABA binding. The inhibition has noncompetitive character. Side by side with the earlier publications concerning the inhibition by NAD of high affinity uptake of GABA by NAD, the results obtained testify to its participation in the processes of pre- and postsynaptic regulation of GABA-ergic system in CNS.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ueda K., Hayaishi O. Ann. Rev. Biochem., v. 54, p. 73—101, 1985.
2. Арутюнян А. В. Нейрохимия, т. 9, № 3, с. 373—389, 1990.
3. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Макушкин Р. Ф., Лобасюк Б. А., Годневский А. С. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 90, № 7, с. 37—41, 1980.
4. Халмуратов А. Г., Кучириковская Т. М., Пархомец П. К. Нейрохимия, т. 6, № 4, с. 495—502, 1987.
5. Williams M. TIBS, v. 7, № 1, p. 164—168, 1984.
6. Stone T. N. Neuroscience, v. 6, p. 529—555, 1981.
7. Richards C. D., Snell C. R., Snell P. M. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 335, p. 63—64, 1983.
8. Арутюнян А. В., Гулян Э. А., Персиянц Ц. М., Априкян Г. В., Кочарян М. Г. Нейрохимия, т. 7, № 3, с. 348—357, 1988.
9. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
10. Abita J., Chechporticke R., Schuetz H., Lazdunsky M. Biochemistry, v. 16, № 9, p. 1838—1864, 1977.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randa'll R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—271, 1951.
12. Раевский К. С., Георгиев В. П. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические аспекты, М., Медицина, 1986.
13. Арутюнян А. В., Мовсисян Н. О., Урганджян М. Г., Бурназян Л. Б. Нейрохимия, т. 3, № 1, с. 41—46, 1984.

14. Тонких А. К., Кузнецов В. И., Каримова М. В., Садыков А. А. Нейрохимия. т. 4, № 3, с. 260—267, 1985.
15. Сергеев П. В., Шимоновский Н. И. — В кн.: Рецензоры физиологических активных веществ, М., Медицина, 1987.
16. Ticks M. K., Buch T. *Biochem. Pharmacol.*, v. 29, p. 1217—1220, 1980.
17. Massotti M., Mazzari S., Schmid R., Guidotti A., Costa E. *Neurochem. Res.*, v. 6, p. 551—565, 1981.
18. Парфенова Е. В. Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 61—73, 1986.
19. Фоменко А. И., Халмурадов А. Г., Пожарун С. В., Степаненко С. П. Нейрохимия, т. 7, № 1, с. 26—32, 1988.
20. Розанов В. А. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 611—628, 1988.

Поступила 30. IV 1991

УДК 612.82.015.1.014.46:615.217

КИНЕТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ МАО ТИПА Б ОТДЕЛОВ МОЗГА ЧЕЛОВЕКА К ДОФАМИНЕРГИЧЕСКОМУ НЕЙРОТОКСИНУ 1-МЕТИЛ-4-ФЕНИЛ, 1,2,3,6-ТЕТРАГИДРОПИРИДИНУ

ЕРМАКОВ Н. В., ИШКОВ А. Г., МИКЕРОВ С. В.

Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, Москва

Исследовали скорость окисления 1-метил, 4-фенил, 1, 2, 3, 6-тетрагидропиридина (МФТП) в МАО-реакции флуориметрическим методом на препаратах фермента, выделенных из 6-и отделов мозга: п. Accumbens, п. Caudatus, Putamen, glob. Pallidus, s. Nigra, loc. Ceruleus. Максимальная скорость образования нейротоксического агента МФП+ отмечена в п. Caudatus. Можно полагать, что этот отдел мозга, в котором локализованы сигналы дофаминергических нейронов, подвержен наибольшему воздействию МФП+ и является местом первичных нарушений функции ЦНС. Выявлены различия между исследованными 4-мя образцами мозга по величине биохимического индекса скорости МАО-реакции (V/K_m), который отражает скорость накопления МФП+ при низких (≤ 1 мкМ) концентрациях МФТП в тканях мозга и связан с индивидуальной чувствительностью лиц к дофаминергическому нейротоксину.

Известны случаи развития симптомов болезни Паркинсона и даже гибели людей, использовавших наркотические анальгетики типа пептидина и сходных с ним аналогов химических соединений [1, 2]. Эти препараты содержали примесь МФТП, оказавшего столь губительное действие на организм человека. Нейротоксический и нейрофармакологический эффекты МФТП определяются длительностью сохранения определенного уровня МФП+ в тканях мозга и зависят от кинетики клиренса нейротоксина из отделов мозга и скорости паработки МФП+ из МФТП в реакции, контролируемой МАО.

Целью настоящей работы является оценка кинетических параметров МАО-реакции к субстрату МФТП, выявление структур мозга с максимальной скоростью образования МФП+ и прогнозирование чувствительности лиц к воздействию нейротоксина МФТП и сходных с ним аналогов химических соединений.

Материалы и методы

В работе был использован мозг 4-х здоровых лиц мужского пола в возрасте 25—50 лет через 3—10 ч после наступления (фиксиро-

вания) клинической смерти в результате несчастных травматических случаев. Мозг после аутопсии охлаждали при 8° в течение 1 ч и затем извлекали дофаминергические и связанные с ними отделы: n. accumbens, n. caudatus, Putamen, globus Pallidus, s. Nigra, loc. Ceruleus. 150—200 мг ткани указанных отделов гомогенизировали в 10-и объемах 0,32 М сахарозы стеклянным гомогенизатором Поттера и получали P₂-фракцию синапсом, содержащую MAO мозга, по стандартной методике Grau и соавт. [3, 4]. Гомогенат центрифугировали при 200 g в течение 10 мин, после чего надосадочную жидкость вновь центрифугировали при 16000 g в течение 20 мин для осаждения синапсом. Осадок, содержащий синапсомы, промывали дважды 0,1 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,4 и суспензировали в нем. Все операции проводили с использованием охлажденных растворов. Для исследования кинетических характеристик MAO типа B 350 мкл суспензии синапсом с концентрацией 0,05—0,20 мг/мл инкубировали в течение 5 мин при 37°. Реакцию начинали введением 50 мкл раствора МФТП в 0,1 М натрий-фосфатном буфере, pH 7,4, достигая конечной концентрации нейротоксина в различных пробах в диапазоне от 0 до 1 мМ. Пробы инкубировали в течение 60 мин при постоянном перемешивании. Реакцию останавливали введением в пробы 0,1 мл смеси, состоящей из равных объемов свежеприготовленных растворов 1,5 М соляной кислоты (HCl) и 10%-ного ДДС-Na. Измерение количества МФП⁺, образовавшегося в пробах в ходе MAO-реакции, проводили на флуориметре при длине волны возбуждения 290 нм и длине волны эмиссии 375 нм, по стандартным растворам МФП⁺. Концентрацию белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [6], используя в качестве стандартных растворов БСА. Расчет кинетических параметров MAO (V образования МФП⁺ и K_m для МФТП) определяли в системе обратных координат Лайнуивера-Берка [7]. Регрессионный анализ проводили на компьютере типа IBM-PC с указанием доверительных интервалов для K_m и V при уровне значимости $p < 0,05$ и ошибки средней величины.

Результаты и обсуждение

В таблице представлены кинетические характеристики мембраносвязанной MAO, содержащейся в препаратах P₂ фракции синапсом различных отделов мозга по 4-м образцам. Наблюдается индивидуальный разброс в величинах V и K_m.

Препараты MAO выделяли из отделов мозга крыс линии *Sprague-Dawley*, которые получали через 3—10 ч после наступления клинической смерти. Режим и сроки хранения животных могли повлиять на кинетические характеристики фермента, в связи с чем были проведены специальные исследования. Установлено, что хранение трупов животных при 4° в течение 48 ч и при 20° в течение 10 ч не приводит к достоверному изменению кинетических характеристик MAO, выделенных из отделов *caudatus, striatum, s. Nigra*.

Из литературных данных известно, что активность МАО мозга (конкретно формы МАО типа Б) увеличивается с возрастом, в особенности после 60 лет. Однако в диапазоне 25—50 лет значения активности МАО типа Б увеличиваются не более чем в два раза [8]. Поэтому причины обнаруженных нами значительных индивидуальных различий в величинах V и K_m следует искать в другом.

В пределах одного и того же отдела мозга отмечены значительные вариации в величине V и K_m . На наш взгляд, условия микроокружения фермента в мембране могут быть причиной различий в функциональных свойствах исследуемой МАО-реакции, отражаясь на величине K_m и V .

$$V = \frac{V \cdot C}{K_m + C} = \frac{V}{K_m} \cdot C,$$

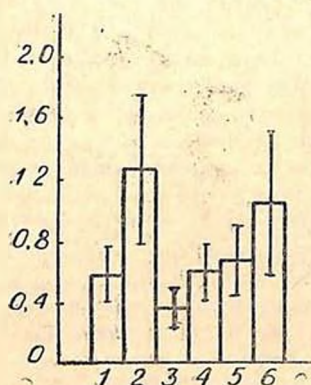


Рис. Значения биохимического индекса МАО-реакции (V/K_m) для 6-и отделов мозга. По оси абсцисс—отделы мозга: 1 п. Accumbens, 2—п. Caudatus, 3—Putamen, 4—glob. Pallidus, 5—s. Nigra, 6—locus Ceruleus, по оси ординат— V/K_m (нмоль МФТП/(мг/ч/мг МФТП))

При низких концентрациях МФТП в тканях мозга порядка 1 мкМ и менее скорость образования МФТП⁺ из МФТП прямо пропорциональна величине V/K_m :

где C —концентрация МФТП; указанный биохимический индекс МАО-реакции (V/K_m) целесообразно оценить в исследуемых отделах мозга, чтобы определить их потенциальную чувствительность к нейротоксину при таких низких концентрациях, которые могут быть созданы при приеме фармакологических доз лекарственных препаратов или поступлении в организм химических соединений, содержащих примесь МФТП или его аналогов, из окружающей среды.

На рисунке представлены данные статистически обработанных значений V/K_m , полученных для 6-и отделов мозга. Наименьшая величина зафиксирована в отделе Putamen, а наибольшая— в зоне п. Caudatus. Если принять во внимание, что в синапсосах, выделенных из этого отдела мозга, имеются и системы обратного захвата дофамина (по которым образованный в МАО-реакции МФТП⁺ попадает внутрь нейрона), то можно считать, что этот отдел дофаминергической системы наиболее чувствителен к воздействию МФТП. Высокий

биохимический индекс МАО-реакции и, следовательно, значительная скорость продуцирования МФП⁺ в п. Caudatus при низких (С—1 мкМ) концентрациях МФТП в мозгу предполагает, что эта зона должна быть местом развития первичных обратимых нарушений функций дофаминергической системы и через нее—ЦНС в целом. locus Ceruleus не имеет систем обратного захвата дофамина, поэтому МФП⁺ не попадает в нейроны этого отдела мозга [9], который, несмотря на высокий биохимический индекс МАО-реакции (V/K_m) проявляет устойчивость к нейротоксину МФТП.

Таблица

Кинетические характеристики МАО отделов мозга человека к МФТП

Отделы мозга	N ₂	K _m (мкМ)	V ($\frac{\text{нмоль МФП}^+}{\text{мг/ч}}$)
nucleus accumbens	1	22,5±0,7	16,2±0,3
	2	306,2±89,7	24,2±5,8
	3	88,9±22,7	77,6±16,4
	4	21,5±1,3	13,0±0,7
nucleus caudatus	1	69,6±5,5	120,9±9,1
	2	140,0±38,1	37,7±7,6
	3	105,3±10,4	269,2±5,8
	4	27,2±2,9	14,2±1,4
Putamen	1	70,5±10,1	18,3±2,2
	2	60,1±9,7	11,6±1,5
	3	76,6±16,8	39,6±7,2
	4	44,4±22,8	5,7±2,2
globus Pallidus	1	54,3±6,1	33,9±3,5
	2	63,5±8,0	12,4±1,4
	3	42,3±9,1	44,2±8,6
	4	28,5±11,4	11,4±2,2
substantia nigra	1	30,0±1,1	14,8±1,8
	2	205,4±159,1	69,0±37,3
	3	55,3±21,9	75,7±3,4
	4	25,2±2,9	7,6±0,8
locus Ceruleus	1	42,9±8,8	35,8±6,3
	2	204,8±44,5	48,0±8,8
	3	181,5±39,8	487,3±135,2
	4	23,8±1,5	9,3±1,6

Отдел s. Nigra представляет собой зону с высокой концентрацией дофаминергических нейронов; воздействие МФТП характеризуется разрушением клеток именно этого отдела, приводя к структурным необратимым нарушениям дофаминергической системы и являясь причиной развития симптомов, сходных с идиопатической болезнью Паркинсона [8]. Высокий индекс МАО-реакции (характеризующий скорость наработки токсического агента МФП⁺), определяемый в s. nigra указывает на этот отдел как на чувствительную мишень. Как правило, структурные изменения в этом образовании мозга являются результатом хронических неоднократных воздействий МФТП. Образующийся МФП⁺, проникая в тело клетки, накапливается нейромеланином и аккумулируется, оказывая длительное воздей-

ствие на нейрон [9, 11]. Накопление МФП⁺ в теле нейрона зоны s. Nigr может происходить и за счет переноса МФП⁺ из синапсов отдела n. Caudatus, хотя эти отделы разделены между собой значительным расстоянием.

Так, исследования на приматах, проведенные Imai H. и соавт. [2], показали, что унилатеральная инфузия МФТП в зону n. caudatus характеризуется разрушением собственно тела нейронов компактной зоны s. nigra. Авторы полагают, что МФТП, трансформируясь в нейротоксический агент МФП⁺, по системам обратного захвата дофамина проникает внутрь синапса [13] и диффундирует по аксону в направлении тела клетки.

Таким образом, высокий индекс MAO-реакции для отделов мозга n. Caudatus и s. Nigra характеризует устойчивость дофаминергической системы мозга к нейротоксину МФТП. При низкой величине клиренса МФТП и МФП⁺ из мозга [14] эти структуры представляют собой наиболее чувствительную мишень воздействия МФТП и его аналогов.

Анализ величины индекса MAO-реакции показывает, что индивидуумы могут различаться по своей чувствительности к МФТП. Можно составить следующий ряд в порядке убывания величины V/K_m для исследованных лиц:

$$3 > 1 > 4 > 2,$$

тем самым определив их чувствительность к нейротоксину.

Предварительные исследования, проведенные на препаратах MAO тромбоцитов крови, показывают, что по своим кинетическим характеристикам MAO тромбоцитов подобна MAO дофаминергических отделов мозга. Так как тромбоциты наиболее доступны для анализа MAO-реакции к МФТП, то прогнозирование устойчивости (чувствительности) лиц к нейротоксину и сходных с ним аналогов целесообразно проводить на полученных из них препаратах MAO.

Лица с высоким индексом MAO-реакции должны характеризоваться быстрым и необратимым развитием нейротоксического эффекта при хроническом воздействии даже малых концентраций МФТП на организм человека. И наоборот, низкий индекс скорости MAO-реакции должен характеризовать устойчивость лиц к нейротоксину и обратимость (нормализацию) функций при неоднократных воздействиях препарата и сходных с ним химических соединений.

KINETIC PARAMETERS OF HUMAN BRAIN MAO CONCERNING DOPAMINERGIC NEUROTOXIN MPTP

YERMAKOV N. V., ISHKOV A. G., MIKEROV S. V.

Research Center of Molecular Diagnostics, Moscow

The kinetic parameters of brain MAO-reaction were investigated to find the areas with a maximal rate of MPP⁺ production. Spectrofluorometric assay of MAO-reaction revealed the following distribution

of the V_{max}/K_m index $\frac{nM \text{ MPP}^+}{(\mu g \cdot \text{hour} \cdot \mu M \text{ MPTP})}$ of the synaptosomal P_2 fraction in the following 6 brain areas: nucl. Caudatus ($1,50 \pm 0,56$), nucl. Accumbens ($0,73 \pm 0,88$), sub t. Nigra ($0,63 \pm 0,25$), glob. Pallidus ($0,57 \pm 0,18$), locus ceruleus ($0,43 \pm 0,18$), Putamen ($0,26 \pm 0,09$).

The highest rate of MPP⁺ production is observed in nucl. Caudatus. It may be assumed that this area is an area of primary functional disturbances under the action of MPTP.

Human brain dopaminergic system is characterised by wide variation in the biochemical index (V_{max}/K_m) of the rate of MAO reaction to MPTP. This indicates an individual sensitivity of 4 patients to the neurotoxin at low ($\leq 10^{-6}$ M) concentration of MPTP in brain tissue.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Davis G. C., Williams F. C., Markey S. P., Ebert M. H., Caine E. D., Reichart C. M., Kopin S. J. Psychiatr. Res., v. 1, p. 249-254, 1979.
2. Langston J. W., Ballard P., Tetrud J. W., Irwin I. Science, v. 219, p. 99-980, 1983.
3. Gray F. G., Whitaker V. P. J. Anat. v. 96, p. 79-88, 1952.
4. Patric R. L., Snyder T. E., Barches J. D. Mol. Pharmacol., v. 11, p. 621-631, 1974.
5. Ермаков Н. В., Ишков А. Г., Микеров С. В., Мирошниченко Е. В. Вopr. мед. химии, № 3, с. 67-68, 1991.
6. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., c. 193, p. 265-271, 1951.
7. Lineweaver H., Burk D. J. Amer. Chem. Sol., v. 56, p. 658-656, 1934.
8. Langston J. W. Life Sci., v. 36, p. 201-203, 1984.
9. Irwin J. Life Sci., v. 36, p. 207-212, 1985.
10. D'Amato R. J., Alexander G. M., Schwartzman R. J., Kitt C. K., Price D. L., Snyder S. M. Life Sci., v. 40, p. 705-712, 1987.
11. D'Amato R. J., Lipman Z. P., Snyder S. H. Science, v. 231, p. 987-989, 1986.
12. Imai H., Nakamura T., Endo K., Narabayashi H. Brain Res., v. 474, p. 327-332, 1988.
13. Javitch J. A., D'Amato R. J., Strittwater S. M., Snyder S. M. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 82, p. 2173-2178, 1985.
14. Langston J. W. Neurosci. Lett., v. 43, p. 87-92, 1984.

Поступила 1. V. 1991

ВЛИЯНИЕ МОРФИНА НА ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ОБЩИХ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА.

ВЕЛИЧКОВА А. А., ТЕНЧЕВА Ц. С.

Институт по изучению мозга, Болгарская Академия Наук, София

Однократное введение морфина в дозе 5 мг/кг крысам на ранних стадиях постнатального развития вызывало увеличение фосфорилирования общих ядерных белков коры больших полушарий головного мозга. Включение меченого фосфата у одноподневных крыс увеличилось на 35%, а к 11-му дню — лишь на 16—17%. У взрослых же животных введение морфина приводило к снижению фосфорилирования белков в гиппокампе на 12%, а в коре больших полушарий — на 26%. Обсуждается вопрос о возможных путях действия морфина на фосфорилирование общих ядерных белков головного мозга.

Обратимость фосфорилирования белков является важным механизмом контроля внутриклеточного метаболизма у всех эукариотов. Уровень фосфорилирования является показателем состояния активности протеинкиназ и протеинфосфатаз, обеспечивающих процессы фосфорилирования и дефосфорилирования. Ядерные протеинкиназы включают ферменты, переносящие γ -фосфат АТР на сериновые, треониновые, тирозиновые или гистидиновые аминокислотные остатки белков. Эти протеинкиназы еще мало изучены, хотя есть уже множество данных об их значимости в регуляции ядерных процессов и специально хромосомной конденсации, митоза и контроля транскрипции [1—3].

Известны литературные данные об изменениях уровня фосфорилирования ядерных белков головного мозга, вызванных сдвигами функционального состояния ЦНС или действием биологически активных веществ, таких как спермин, адреналин, энкефалины и их производные, а также, в частности, морфин [4—7]. Изменения под влиянием этих веществ зависят от конкретного периода развития организма, когда имеет место такое воздействие.

Несмотря на широкое исследование влияния морфина на организм, продолжает вызывать интерес, в частности, изучение механизма его биохимического действия при однократном и хроническом введении. При однократном введении, как показывают исследования последних лет, морфин проявляет свое действие через G-белки, ко-

торые представляют собой мембраносвязанные группы белков с выраженным сродством к GTP [8]. Литературные данные свидетельствуют о том, что морфин влияет на аденилатциклазу (АЦ), вызывая, в зависимости от продолжительности его воздействия, активирование или ингибирование фермента [9, 10]. Установлено, что в системе *in vitro* морфин не действует на посттрансляционное фосфорилирование белков [4]. В литературе отсутствуют данные о влиянии морфина на фосфорилирование ядерных белков на ранних этапах развития, тогда как в этот период уровень посттрансляционной модификации белков, так же как и влияние биологически активных веществ, являются максимально высокими.

Цель настоящей работы—исследование влияния морфина на фосфорилирование общих ядерных белков, выделенных из головного мозга крыс в постнатальном периоде развития, и определение значения зависимости степени происходящих изменений от продолжительности воздействия морфина.

Материалы и методы

Опыты были проведены на крысах-самцах линии *Wistar*. Животным подкожно вводили морфин из расчета 5 мг/кг однократно, а в отдельной серии—4 раза в той же дозе с интервалом в 12 ч.

Одну из групп подопытных животных составляли крысы 1-, 4- и 11-го дня после рождения, которым вводили морфин однократно. В другой группе были взрослые животные (3-месячные), которым вводили морфин однократно и повторно (4 раза). Через 2 ч после введения морфина животных декапитировали, извлекали головной мозг, у животных 1-й группы выделяли лишь кору больших полушарий (КБП), а у животных 2-й группы—КБП и гиппокамп. Ткань гомогенизировали в смеси, содержащей 1,8 М сахарозу, 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ трис- HCl , pH 7,4, центрифугировали в SW-роторе RPS-25-2 на ультрацентрифуге «Hitachi» при 91000 g 60 мин. Ядерную суспензию (50 мкг ДНК) инкубировали 5 мин в реакционной смеси, содержащей 0,32 М сахарозу, 1 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl , 50 мМ $NaCl$, 5 мМ $Na_2P_2O_7$, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мМ трис- HCl (pH 7,4), 3 мкКи $\gamma^{32}P$ -АТФ («Amersham», Англия). Фосфорилирование общих ядерных белков определяли способом пипетирования 20 мкл инкубационной смеси на фильтрах Whatman GF/A. Белки фиксировали в 10%-ной ТХУ, содержащей 0,5 М $Na_2P_2O_7$ и высушивали этанолом и эфиром. Радиоактивность определяли в сцинтилляционном растворе, содержащем 4 г PPO, 0,4 г POPOP в 1 л толуола на счетчике «Beckman 3801» (Австрия).

Количество белка определяли методом Lowry и соавт. [11].

Результаты и обсуждение

Морфин в использованной нами дозе 5 мг/кг, по литературным данным, не влияет на синтез белка в течение 3 ч после введения пре-

парата. В более высоких дозах (10 и 25 $\mu\text{г}/\text{кг}$) морфин первоначально ингибирует, а затем активирует включение меченых аминокислот в молекулы белка [12]. Нам обнаружено, что однократное введение морфина на ранних стадиях постнатального развития вызвало повышение уровня фосфорилирования общих ядерных белков КБП крыс (рис. 1). Повышение включения меченого фосфата оказалось наиболее выраженным у животных 1-го дня жизни на 35%, к 4- и 11-му дням постнатального развития уровень белкового фос-

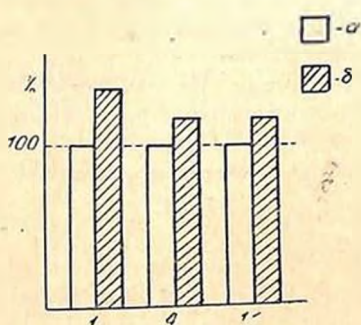


Рис. 1. Влияние морфина на фосфорилирование общих ядерных белков коры больших полушарий мозга крыс в процессе постнатального развития. Однократное введение морфина в дозе 5 $\text{мг}/\text{кг}$ крысам в возрасте 1,4 и 11 дней после рождения, $n=6$; здесь и на рис. 2, 3: а—контроль, б—морфин.

форилирования снижался, достигая прироста лишь на 16—17%. Эти результаты соответствуют полученным ранее данным о влиянии ряда биологически активных веществ на фосфорилирование белков, в которых было показано, что наиболее выраженный эффект обнаруживался именно в эмбриональный период развития и 1-й постнатальный день [7].

Для того, чтобы объяснить действие морфина на фосфорилирование белков, необходимо иметь в виду время появления и формирования опиоидных рецепторов. С помощью автордиографии они были выявлены и определены в ЦНС крыс на 14-й день эмбрионального развития. При этом число рецепторов для морфина оказалось достаточно низким, оно мало изменялось в первые дни постнатального развития, а затем быстро увеличивалось в период между 2- и 3-й неделями постнатального онтогенеза [13—16]. По данным Zhang и соавт. [17], у новорожденных животных при введении морфина имело место значительное снижение дыхания по сравнению с 14-дневными животными. Это дает основание предполагать, что влияние морфина в первые постнатальные дни жизни связано с изменением функциональной активности ЦНС, сопровождаемой активированием протеникиназ [17].

Основной путь действия морфина реализуется через активность АЦ, в результате чего изменяется концентрация сАМР в клетках [9, 10]. Наши исследования показали, что в первые дни после рождения уровень фосфорилирования общих ядерных белков не изменяется под влиянием сАМР, что свидетельствует о низком уровне активности фермента в этот период. Изученное нами фосфорилирова-

ние общих ядерных белков обусловлено главным образом действием сАМР-независимых, Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеникиназ и протеникиназы С. Полученные данные позволяют предполагать, что на ранних стадиях постнатального развития морфин вызывает активирование белкового фосфорилирования, что является компенсаторным механизмом при понижении интенсивности дыхания под влиянием морфина.

По литературным данным, морфин в такой же дозе использовали и другие авторы. При этом однократное введение его в этой же дозе вызывало ингибирование синтеза ДНК у животных на 4-й день после рождения, не действуя на более поздних сроках развития [18].

Авторы высказывают предположение, что морфин, вероятно, оказывает влияние на клеточную пролиферацию путем генерализован-

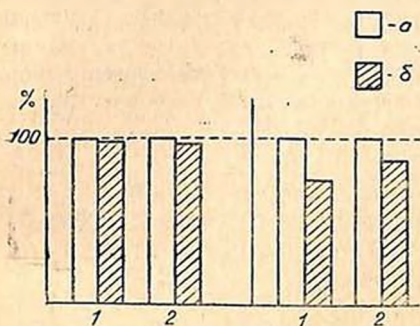


Рис. 2. Влияние морфина на фосфорилирование ядерных белков, выделенных из мозга взрослых крыс. 1—кора больших полушарий, 2—гиппокамп. Однократное введение морфина в дозе 5 мг/кг, $n=6$.

Рис. 3. Изменения фосфорилирования общих ядерных белков после 4-кратного введения морфина в дозе 5 мг/кг с интервалом 12 ч половозрелым животным. 1—кора больших полушарий, 2—гиппокамп, $n=6$.

ного метаболического воздействия. Установленное нами активирование фосфорилирования в ранние сроки постнатального развития свидетельствует именно о подобных метаболических изменениях.

При исследовании влияния морфина на фосфорилирование белков в КБП и гиппокампе взрослых животных было показано, что плотность морфиновых рецепторов в этих структурах НС высока [16]. В наших опытах однократное введение морфина в дозе 5 мг/кг не вызывало изменений фосфорилирования общих ядерных белков, выделенных из КБП и гиппокампа (рис. 2). Однократное введение морфина даже в более высоких дозах не вызывало изменений фосфорилирования белков микросомных фракций [20]. В синапсомной фракции этих же структур мозга не установлено изменения включения меченого фосфата [20]. Отсутствие изменений в посттрансляционной модификации общих ядерных белков, выделенных из КБП и гиппокампа, свидетельствует о высокой резистентности половозрелых животных к действию морфина. Учитывая гетерогенность нервной ткани, следует полагать, что полученные нами результаты суммируют специфические ответы разных типов ее клеток, так как возможна активация одних, торможение или отсутствие реакции у других. Изменение активности АЦ-системы одной клеточной популяции

может сглаживать реципрокные изменения или отсутствие таковых у других популяций.

Увеличение интенсивности включения меченых аминокислот связывают с продолжительностью действия морфина [12]. Нами установлено, что 4-кратное введение морфина приводило к снижению фосфорилирования белков в гиппокампе на 12% и в КБП на 26% (рис. 3). Наряду с этим Duman и соавт. [10] показали ингибирование АЦ-активности во фронтальной зоне КБП на 20—25%. Это дает основание предположить, что наблюдаемое нами понижение фосфорилирования белков являлось следствием пониженной активности cAMP-зависимой протеинкиназы.

Полученные результаты дают основание сделать заключение о наличии возрастной зависимости уровня фосфорилирования белков при воздействии морфина. Однократное введение морфина в ранний период постнатального развития увеличивало интенсивность включения меченого фосфата в белках, тогда как 4-кратное введение морфина половозрелым животным сопровождалось снижением включения меченого фосфата.

THE EFFECT OF MORPHINE TREATMENT ON POSTTRANSLATIONAL PHOSPHORYLATION OF THE RAT BRAIN TOTAL NUCLEAR PROTEINS DURING VARIOUS STAGES OF ONTOGENESIS

VELICHKOVA A., TENCHEVA Z.

Brain Research Institute, Bulgarian Academy of Science, Sofia

Single administration of morphine (5 mg/kg body weight) to rats in the early stages of postnatal development increased phosphorylation of total nuclear proteins of brain cortex. The incorporation of labelled phosphate increased by 35% after morphine application to newborn rats and by 16—17% on the 11th day after birth.

The effect of morphine on phosphorylation of total nuclear proteins isolated from brain cortex and hippocampus of mature animals was also studied. Single morphine treatment does not cause any change, whereas four successive morphine injections at 12-hour intervals resulted in a 12% reduction of nuclear protein phosphorylation in hippocampus and a 26% reduction in brain cortex.

The possible mechanisms of morphine action on total nuclear protein phosphorylation are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weller M. Protein phosphorylation, Academic Press, New York, 1979.
2. Cohen P. Recently discovered systems of enzyme regulation by reversible phosphorylation. Elsevier, North Holland-Amsterdam, 1980.

3. Rosen P. O., Krebs E. G. Cold Spring Harbor Conference on cell Proliferation, v. 8, 1981.
4. Oguri K., Lee N., Loh H. Biochem. Pharmacol., v. 25, p. 2371—2376, 1976.
5. Das R., Kanungo M. Indian J. Biochem. Biophys., v. 17, p. 217—221, 1980.
6. Витоцкий В. Н. Журн. общей биологии, т. 14, № 1, с. 183—193, 1983.
7. Величкова А., Тенчева Ц., Венков Л. Строеж и функции на мозъка, София, т. 15, с. 38—43, 1989.
8. Nestler E., Erdos J., Terwüger R., Daman S., Tallman J. Brain Res., v. 476, p. 230—239, 1989.
9. Cooper D., Gill D., Rodbell M. J. J. Neurochem., v. 38, p. 1164—1167, 1982.
10. Ruman S., Tallman J., Nestler E. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 246, p. 1033—1039, 1983.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
12. Rönnebeck L., Hansson E. Biochem. Pharmacol., v. 35, p. 3685—3692, 1986.
13. Wohlmann M., Roth B., Coscia C. Dev. Brain Res., v. 3, p. 679—684, 1982.
14. Spain J., Roth B., Coscia C. J. Neurosci., v. 5, p. 584—588, 1985.
15. Unerstal J., Moliver M., Kukar M., Palacios M. Dev. Brain Res., v. 23, p. 306—307, 1985.
16. Kornblum H., Ilaribut D., Leslie F. Develop. Brain Res., v. 37, p. 21—41, 1987.
17. Zhang A.-Z., Pasternak G. Eur. J. Pharmacol., v. 73, p. 29—40, 1981.
18. Kornblum H., Laughlin S., Leslie F. Develop. Brain Res., v. 31, p. 45—52, 1987.
19. Clark A., Jovic R., Ornellas M., Weller M. Biochem. Pharmacol., v. 21, p. 1939—1990, 1972.
20. Crowder J., Norris D., Bradford H. Biochem. Pharmacol., v. 35, p. 2501—2502, 1936.

Поступила 17. III. 1991

УДК 616—008.939.633.2—02:616—008.931:577.152.311

ОЧИСТКА ФДЭ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ГИПОТАЛАМУСА МЕТОДОМ ГИДРОФОБНОЙ ВЭЖХ

АБРАМЯН Г. Э., ЧАИЛЯН С. Г., ИСАДЖАНЫН М. А.,
КИРАКОСОВА А. С., ГАЛОЯН А. А.

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

Разработан метод гидрофобной ВЭЖХ ФДЭ циклических нуклеотидов из гипоталамуса, основанный на ЭГТА-зависимой элюции с колонки, где в качестве неподвижной фазы применялся фенил-полиметакрилатный гель. В сравнении с традиционными методами очистки на фенил-сефарозе, предложенный метод позволяет существенно сократить время проводимых процедур и достичь высокой степени эффективности разделения в малых объемах элюции при комнатной температуре.

Ca^{2+} -кальмодулинзависимая ФДЭ циклических нуклеотидов, обнаруженная впервые Kakiushi и Yamasaki в мозговом экстракте, является важнейшим ферментом метаболизма клетки [1, 2]. Способность данного фермента Ca^{2+} -зависимым образом взаимодействовать с гидрофобными матрицами легла в основу методик очистки ФДЭ на фенил-сефарозе [3--5]. Но поскольку подобное взаимодействие характерно и для других Ca^{2+} -зависимых белков, неизбежно появляется необходимость дополнительных мер очистки, что существенно увеличивает продолжительность проводимых процедур и, как правило, в подобных случаях усиливается подверженность ФДЭ к воздействию протеолитических ферментов, сопровождающаяся резким снижением индуцированной кальмодулином активности фермента. К тому же, данный метод характеризуется продолжительностью проведения экспериментов при 4° , большими объемами элюции, низким пределом обнаружения и малой разрешающей способностью. Изучая регуляцию активности ФДЭ биоактивными соединениями гипоталамуса, мы пришли к заключению, что традиционные методы хроматографии не приемлемы для очистки фермента в аналитических целях. В этой связи нами предпринята попытка иного подхода к обсуждаемой проблеме и предлагается быстрый метод очистки ФДЭ, основанный на гидрофобной ВЭЖХ, что позволяет идентифицировать пики ферментативной активности в малых количествах (0,3—3 мг

белка) гипоталамической ткани в течение 30 мин при комнатной температуре и малых объемах элюции (1—2 мл на пик ферментативной активности), достигая при этом 200-кратной очистки фермента.

Материалы и методы

В работе были использованы cAMP, cGMP, ЭГТА, препараты кальмодулина и 5'-нуклеотидазы из яда *Opheophagus Hannah* («Sigma», США); Dowex 1×2 трис-HCl, MgCl₂, CaCl₂, NaN₃ («Serva», Германия); «Phenyl-Sepharose» («Pharmacia», Швеция); 8 [³H]cAMP, 8 [³H]cGMP; все остальные реактивы—отечественного производства квалификации ос. ч.

Очистку ФДЭ осуществляли по методу, предложенному ранее [3], с некоторыми модификациями [4]. Измельченную ткань гипоталамуса, хранившуюся при температуре —70°, гомогенизировали 3—5 мин в 10 объемах буферного раствора А, содержащего 25 мМ трис-HCl, pH 7,0, 2 мМ MgCl₂, 0,2 М NaCl при 4° в стеклянном гомогенизаторе. Гомогенат центрифугировали в течение 60 мин при 24000 g, в супернатант добавляли CaCl₂ в конечной концентрации 2 мМ и наносили на колонку «Phenyl-Sepharose» (1,5×10 см), предварительно уравновешенную буфером В, содержащим 0,2 М NaCl. Скорость элюции 1 мл/мин. ФДЭ элюировали буфером В с добавлением 0,2 мМ ЭГТА. Скорость элюции 1 мл/мин. Контроль осуществляли по изменению оптической плотности (λ—280 нм) и фосфоэстеразной активности. Все операции проводили при 4°.

Фракции с «Phenyl-Sepharose», обладающие наибольшей ферментативной активностью (2 мл), собирали и концентрировали ультрафильтратом «Amicon» (США) на мембране PM-30 (Pellicon-membrane 30000). Давление в ячейке поддерживали на уровне 3,5 атм при 0°.

Гидрофобную ВЭЖХ проводил на колонке HIC PH-814 («Shodex», Япония, 75×80 мм), (8×20 мм) предварительно уравновешенную 0,1 М фосфатным буферным раствором С, pH 7,0 1 М (NH₄)₂SO₄ и 2 мМ CaCl₂. Колонку промывали 50 мл буфера С. Элюцию ФДЭ осуществляли линейным градиентом сульфата аммония от 1 до 0 М за 60 мин в присутствии 2 М ЭГТА. Все операции на колонке «Shodex» проводили с постоянной скоростью 1 мл/мин при комнатной температуре с использованием жидкостного хроматографа высокого давления «Knauer» (Германия). Положение ФДЭ на профиле элюции определяли, измеряя ферментативную активность. Фракции, обладающие наибольшей активностью, объединяли и концентрировали с использованием ультрафильтрата «Amicon» на мембране PM-30.

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson и соавт. [6] с применением меченого 8 [³H]cAMP или 8 [³H]cGMP. Инкубационная смесь (200 мкл) содержала 50 мМ трис-HCl, pH 7,0, 10 мМ

MgCl₂, 2 мМ CaCl₂ ил 2 мМ ЭГТА, 100 кБк 8 [³H]сАМР или 8 [³H]сGMP, 5 мМ β-меркаптоэтанол и 5 мкМ сАМР. Реакцию начинали добавлением фермента. Через 5—15 мин инкубации при 30° пробы кипятили 1,5 мин, охлаждали до 30° и добавляли в них 0,2 мг/мл раствора 5'-нуклеотидазы яда *Ophe phagus Hannah*. Реакцию, катализируемую этим ферментом, проводили при 30° в течение 10 мин. Сорбцию негидролизованного субстрата осуществляли на анионообменнике Dowex 1×2 (Cl-форма), добавляя 1 мл суспензии смолы (1:2) в среду инкубации. После перемешивания пробы центрифугировали 5 мин при 12000 g, 0,3 мл супернатанта помещали в 5 мл сцинтиллятора ЖС-7 и проводили измерения радиоактивности на жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Intertechnique 2000» (Франция). Скорость ферментативной реакции выражали в относительных единицах активности (о. е. а.)—процент гидролиза субстрата на концентрацию субстрата в пробе за 1 мин на 1 мкл фермента.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлен профиль элюции ФДЭ с «Phenyl-Sepharose». ФДЭ элюируется двумя симметричными пиками с незначительным запаздыванием относительно общей массы белка. Активность пика I и пика II в присутствии Ca²⁺ и кальмодулина увеличивалась в 3 и 6 раз соответственно, а для пика I характерным являлась стимуляция гидролиза сАМР под действием микромолярных концентраций сGMP. Следовательно, можно говорить о наличии, по крайней мере, двух изоформ фермента: Ca²⁺-кальмодулинзависимой и сGMP-стимулируемой ФДЭ. Таким образом, при помощи гидрофобной хроматографии «Phenyl-Sepharose» удается выделять две формы фермента, отличающиеся по своим физико-химическим и регуляторным свойствам.

На рис. 2 представлен профиль элюции ФДЭ линейным градиентом сульфата аммония (1—0 М) в присутствии 2 мМ ЭГТА с колонки HCl PH-814. Как видно из рисунка, элюция приводит к появлению хорошо различимых трех пиков ферментативной активности—А (0,77 М), В (0,52 М), С (0,4 М). Данные по измерению активности ФДЭ при использовании в качестве субстратов сАМР и сGMP, приведенные в таблице, показывают, что для субстрата сGMP, активность ФДЭ-I не изменяется как под действием свободных ионов кальция, так и Ca²⁺-кальмодулина. Скорость гидролиза сGMP при внесении в реакционную среду, содержащую ФДЭ-II и ФДЭ-III, Ca²⁺ не увеличивается, но возрастает в присутствии Ca²⁺ и кальмодулина. В присутствии субстрата сGMP активность пика II и пика III увеличивается под действием комплекса Ca²⁺-кальмодулина, но при этом отсутствует активация под действием свободных ионов кальция. По регуляторным свойствам ФДЭ-I отличается от ФДЭ-II и ФДЭ-III.

Наряду с сGMP, скорость гидролиза сAMP увеличивалась свободными ионами кальция, что, вероятно, объясняется наличием во фракции пика-I примесей кальмодулинзависимой ФДЭ.

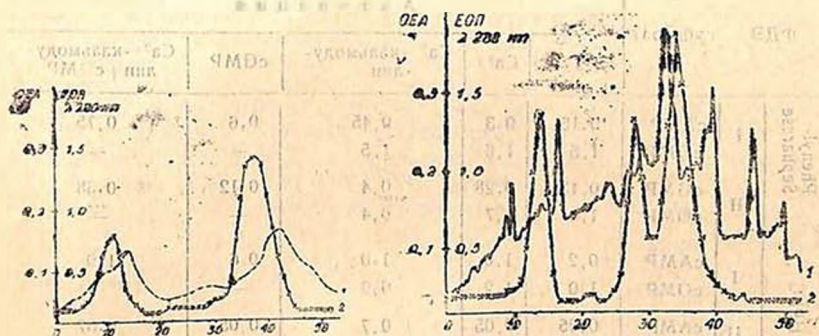


Рис. 1. Очистка ФДЭ методом гидрофобной хроматографии на «Phenyl-Sepharose». Супернатант гомогената гипоталамуса наносили на колонку (8×150 мм), предварительно уравновешенную 25 мМ трис-НСl буфером, pH 7,0, содержащим 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ $CaCl_2$, 0,1 мМ β -меркаптоэтанол, 0,2 М NaCl. Колонку промывали тем же буфером, после чего блок элюировали в присутствии 2 мМ ЭГТА в режиме линейного градиента NaCl от 0,2 до 0 М при скорости потока 1 мл/мин при 4°. Профиль элюции определяли по измерению оптической плотности при λ 280 нм (1) и базальной активности ФДЭ (2)

Рис. 2. Очистка ФДЭ методом гидрофобной ВЭЖХ. Супернатант гомогената гипоталамуса в количестве 500 мкл (1 мг белка) наносили на колонку «Shodex HC PH-814» (0,75×8 см), предварительно уравновешенную 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,0, содержащим 1 М сульфата аммония, 5 мМ $MgCl_2$ и 2 мМ $CaCl_2$. Колонку промывали тем же буфером, после чего элюцию осуществляли в присутствии 2 мМ ЭГТА в режиме линейного градиента сульфата аммония от 1 до 0 М в течение 60 мин при скорости потока 1 мл/мин. Температура комнатная. Обнаружение продукта осуществляли по измерению оптической плотности при λ 280 нм (1) и базальной активности ФДЭ (2)

Таким образом, гидрофобная ВЭЖХ на колонке «Shodex HC PH-814» позволила разделить три формы фермента. Для ФДЭ-I характерно увеличение скорости гидролиза сAMP под действием сGMP, что позволяет отнести ее к сGMP-регулируемой изоформе ФДЭ. ФДЭ-II и ФДЭ-III характеризует Ca^{2+} -кальмодулинзависимая модуляция, проявляемая для гидролиза как сAMP, так и сGMP. Следовательно, ФДЭ-II и ФДЭ-III можно отнести к Ca^{2+} -кальмодулин-стимулируемым изоформам фермента.

Поскольку хроматография ФДЭ на гидрофобных сорбентах имеет явно выраженный Ca^{2+} -зависимый характер, то можно предположить, что комплекс кальмодулин-ФДЭ при избыточных концентрациях Ca^{2+} взаимодействует с фенильным лигандом за счет гидрофобных участков, расположение которых связано, по всей видимости, непосред-

Активность ФДЭ, элюированных с колонок «Phenyl-Sepharose» и «Shofex»

ФДЭ		субстрат	А к т и в а ц и я				
			ЭГГА	Ca ²⁺	Ca ²⁺ -кальмодулин	cGMP	Ca ²⁺ -кальмодулин+cGMP
Phenyl-Sepharose	I	cAMP	0,15	0,3	0,45	0,6	0,75
		cGMP	1,5	1,6	1,5	—	—
	II	cGMP	0,13	0,28	0,4	0,12	0,38
		cGMP	1,8	1,7	0,4	—	—
Shofex HPLC	I	cAMP	0,2	1,0	1,0	0,6	1,9
		cGMP	1,0	1,2	0,9	—	—
	II	cAMP	0,05	0,05	0,7	0,05	0,67
		cGMP	0,5	0,5	7,8	—	—
	III	cAMP	0,08	0,08	1,6	0,07	1,5
		cGMP	1,0	1,1	13,8	—	—

ственно на поверхности кальмодулина либо на индуцированной области на поверхности ФДЭ за счет Ca^{2+} -зависимой ассоциации фермента с кальмодулином. При потере Ca^{2+} под действием хелатирующего агента происходят изменения в гидрофобных свойствах фермента, приводящей к быстрой потере способности ФДЭ связываться с фенольной матрицей. Таким образом, эксперименты, проведенные с использованием гидрофобных фенольных матриц, показали, что переводом очистки ФДЭ на фенольных матрицах в условиях ВЭЖХ можно достичь более четкого разделения пиков изоформ ФДЭ в малых объемах с достаточно высокой степенью ферментативной активности.

RESOLUTION OF HYPOTHALAMUS CYCLIC NUCLEOTIDE PHOSPHODIESTERASES BY HYDROPHOBIC HPLC

ABRAHAMIAN G. E., CHAILYAN S. G., ISAJANYAN M. A.,
KIRAKOSOVA A. S., GALOYAN A. A.

G. Ch. Bunyatyany Institute of Biochemistry, Academy of Sciences
of Armenia, Yerevan

A HPLC method has been developed to separate isozymes of cyclic nucleotide phosphodiesterase. The method employs a phenyl- hydrophilic polymetacrilate based hydrophobic interaction column eluted with a EGTA-dependent ammonium sulfate gradient. Compared to traditional chromatography over Phenyl-Sephadex, the method is more rapid (30 min), dilutes the sample less, achieves better resolution of kinetically distinct forms, may be applied to little of tissue protein and is appropriate for analytical use.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kahluchi S., Yamasaki R.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 41, p. 1104—1113, 1970.
2. *Devo J. A., Hansen R. S., Harrison S. A., Hurvitz R. L., Martins T. J., Mumby M. C.* Mol. Cell. Endocrinol., v. 28, p. 387—399, 1982.
3. *Gopalakrishna R., Anderson W. B.* J. Biol. Chem., v. 253, N 4, p. 2405—2409, 1983.
4. *Бобрускин Н. Д., Шайхин С. М., Муратова М. В., Баранова Л. А., Своякин С. Е.* Биохимия, т. 52, № 8, с. 1344—1351, 1987.
5. *Бобрускин Н. Д., Муратова М. В., Киреева Н. Н., Белов А. А., Своякин С. Е.* Биохимия, т. 54, № 9, с. 1499—1507, 1989.
6. *Thompson W. J., Appleman M. M.* Biochemistry, v. 10, p. 311—316, 1971.

Поступила 15. VI 1991

ГЕМОГЛОБИН—ПРЕДШЕСТВЕННИК КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ

БАРХУДАРЯН Н. А., *КЕЛЛЕРМАН И., *ЛОТШПАЙХ Ф., ГАЛОЯН А.А.

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

*Институт биохимии им. Макс-Планка, Мюнхен

Исследованы свойства синтетических пептидов—VVVPRWT, LVVVPRWT, LVVPRWTQ, LVVVPRWTQRF, полученных методом твердофазного синтеза на основе известной первичной структуры гипоталамических коронаросуживающих пептидных факторов, 3 из которых, как было установлено нами, оказались фрагментами 33-37, 33—38 и 32—38 β-цепи гемоглобина. Исследуя воздействия синтетических пептидов на тест-системы, специфичные для пативных коронаросуживающих пептидных факторов, обнаружили идентичность свойств синтетических и пативных пептидов. Обсуждается вопрос об образовании коронаросуживающих пептидных факторов в условиях *in vivo*.

В 1988 г. мы сообщили о выделении и очистке 5 коронаросуживающих пептидных факторов (ПФ₁₋₅) из гипоталамуса крупного рогатого скота [1]. Нами было установлено, что ПФ₁₋₅ вызывают Ca²⁺-независимую активацию ряда Ca²⁺-кальмодулинзависимых ферментов [2—4], таких как киназа легких цепей миозина (КЛЦМ), кальмодулинчувствительная ФДЭ cAMP, путем Ca²⁺-независимого связывания с кальмодулином [5—7]. Было выдвинуто предположение, что ПФ₁₋₅ являются аллостерическими регуляторами кальмодулина, приводящими его структуру, в зависимости от своей концентрации, в различные активные конформационные состояния [5—6]. Дальнейшие исследования показали, что ПФ₁₋₅ стимулируют процесс агрегации тромбоцитов (от 25 до 30%) и сокращение изолированной аорты кролика (от 20 до 25%) [2, 3]. Стимуляция обоих этих процессов связана с активацией КЛЦМ комплексом кальмодулин—ПФ [4]. В данном случае ПФ₁₋₅ выполняют функцию ионов кальция, являясь, по-видимому, его эндогенными заместителями. На основании полученных данных мы пришли к заключению, что коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса можно причислить к числу Ca²⁺-независимых регуляторов в клетке, которые, возможно, и в условиях *in vivo* могут принимать участие в регуляции активности КЛЦМ, ФДЭ cAMP и, вероятно, других Ca²⁺-кальмодулинзависимых систем (при низком внутриклеточном уровне содержания Ca²⁺).

В недавно проведенных исследованиях по выяснению первичной структуры ПФ₁₋₅ было обнаружено, что 3 из них являются фрагментами 33—37, 33—38 и 32—38 β-цепи гемоглобина [4, 8].

Интересно отметить, что в литературе имеются данные о том, что сама молекула гемоглобина обладает коронаросуживающими свойствами [9, 10]. Кроме того, оказалось, что еще в 1980 г. Чапгом и соавт. [11] из гипоталамуса свиньи были выделены 2 пептида, которые являлись фрагментами 32—40 и 31—40 β -цепи гемоглобина. Однако биологическая активность этих пептидов не была установлена. Оказалось также, что геморфины—пептиды, полученные в результате протеолитического распада гемоглобина и обладающие сильными опноидными свойствами, являются фрагментами 34—37 и 34—38 β -цепи гемоглобина [12].

На основании полученных нами данных, а также имеющейся в литературе информации было сделано предположение, что остальные 2 коронаросуживающих ПФ с невыясненной пока первичной структурой также являются фрагментами β -цепи гемоглобина, отличающиеся от структуры вышеуказанных коронаросуживающих ПФ лишь длиной пептидной цепи.

Для проверки указанного предположения, а также с целью исследования свойств синтетических пептидов (П), полученных согласно выявленной структуре нативных коронаросуживающих ПФ, были синтезированы 4 пептида, представляющие фрагменты 32—39 (P_1), 32—41 (P_2), 32—38 (P_3) и 33—38 (P_4) β -цепи гемоглобина.

Данная статья посвящена изучению воздействия синтетических пептидов на тест-системы, специфичные для нативных ПФ₁₋₃ с целью сравнения активности и механизма действия синтетических и нативных пептидов.

Материалы и методы

Коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса выделяли по методу Галояна и соавт. [1].

Автоматический твердофазный синтез был осуществлен на синтезаторе «Applied Biosystems Model 430A», с использованием Fmoc-защитных групп [13].

Для определения образования иммунного комплекса кальмодулин-антитело был использован метод непрямого ферментзависимого иммуносорбентного анализа (ELISA) с некоторыми модификациями по методу Van Eldik и соавт. [14]. Кальмодулин (в концентрации 2,5 мкг/мл) был иммобилизован на платах при 4° в течение 18 ч. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл и платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. В экспериментах по определению влияния ПФ на образование иммунного комплекса ПФ вносили в лунки плат вместе с антителами. Использовали различные концентрации ПФ (от 0,8 мкМ до 1,6 нМ). Анти-IgG, конъюгированный с пероксидазой хрена вносили в лунки плат в разведении 1:1000 и платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Через 60 мин после добавления субстрата (H_2O_2 и *o*-фенилендиамина) содержимое

лунок фиксировали добавлением 2 н. H_2SO_4 и измеряли поглощение при 492 нм.

Высокоочищенные препараты КЛЦМ получали по методу Dabrowska и соавт. [15—16] из желудков кур. Фосфорилирование легких цепей (ЛЦ) миозина гладкой мускулатуры желудка кур с M_r 20 кД проводили в течение 25 мин при 25° в инкубационной среде, содержащей 70 мкг очищенного миозина, 20 мМ фосфатного буфера, pH 8,0, 12,5 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ CaCl_2 , 5 мМ АТР, 1,5 мкМ КЛЦМ и 4,5 мкМ кальмодулина. Включение фосфата в ЛЦ миозина регистрировали при электрофорезе в ПААГ в присутствии 8 М мочевины по методу Pegg и соавт. [17]. Относительное содержание фосфорилированных ЛЦ в миозине определяли при анализе денситограмм гелей электрофореза, окрашенных Кумасси R-250.

Количество белка определяли по методу Lowry и соавт. [18]. Эксперименты на изолированной аорте кролика проводили по методу Капатогі и соавт. [19].

Агрегацию тромбоцитов исследовали на агрегометре «Payton» (США) с использованием в качестве агреганта 5 мкМ АДФ. Исследования проводили на крови здоровых доноров. Богатую тромбоцитами плазму получали центрифугированием крови при 2000 g в течение 10 мин по методу Born [20].

В работе были использованы следующие реактивы: АТР, АДФ («Sigma», США), CNBr—активированная сефароза 4B, сефакрил S-300, сефадекс G-10, фенол-сефароза («Pharmacia», Швеция), MgCl_2 , CaCl_2 , ацетонитрил («Merck», ФРГ), ЭГТА, Кумасси R-250, акриламид, бис-акриламид, TEMED, персульфат аммония, Dowex 50W $\times$ 8, («Sigma», ФРГ), остальные реактивы марок х.ч. и ос.ч. («Союзхимреактив»).

Результаты и обсуждение

Одним из наиболее чувствительных тестов для PF_{1-5} является их способность ингибировать образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело путем Ca^{2+} -независимого связывания с кальмодулином [5—7]. Поэтому прежде всего было изучено влияние синтетических пептидов на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело с помощью метода ELISA.

На рис. 1 представлены данные относительно влияния нативных PF_3 и PF_4 и соответствующих им по структуре синтетических пептидов (P_3 и P_4) на образование иммунокомплекса. Как видно из рис. 1, P_3 и P_4 подобно PF_3 и PF_4 в значительной степени ингибируют образование иммунокомплекса. Концентрации, вызывающие 50%-ное ингибирование образования иммунокомплекса (I_{50}), равны 5,4; 12,8; 21,8; 33,4 нМ для PF_3 , PF_4 , P_3 и P_4 соответственно. Для P_1 и P_2 величины I_{50} были равны 24,6 и 29,5 нМ соответственно. Принимая во внимание тот факт, что для PF_{1-5} величины I_{50} находятся в диапазоне концентраций от 2,5 до 31,6 нМ [5, 6], мы можем зак-

лючить, что синтетические пептиды обладают таким же сродством к кальмодулину, как и нативные. Тем не менее, нужно отметить, что ПФ₃ и ПФ₄ были несколько более активны, чем П₃ и П₄.

Как было указано выше, гипоталамические ПФ₁₋₅ вызывают Са²⁺-независимое активирование некоторых Са²⁺-кальмодулинзависимых ферментов [2-4]. В этом аспекте более детально нами было изучено воздействие ПФ₁₋₅ на активность КЛЦМ, выделенной из скелетной и гладкой мускулатуры. В частности, было установлено,

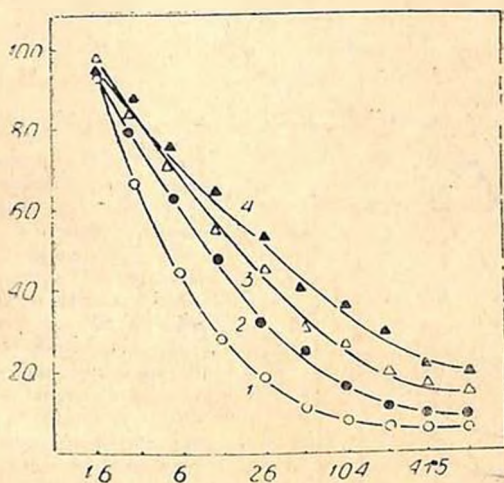


Рис. 1. Влияние нативных коронаросуживающих пептидных факторов (ПФ₁—1; ПФ₂—2) и синтетических пептидов (П₃—3; П₄—4) на образование иммунореактивного комплекса кальмодулин-антитело. Кальмодулин был иммобилизован на плитах в концентрации 2,5 мкг/мл, а антитела использовали в концентрации 7,5 мкг/мл. По оси абсцисс—концентрации пептидов в нМ. По оси ординат—% связывания антител с кальмодулином

что ПФ₁₋₅ осуществляют свое воздействие на активность КЛЦМ путем Са²⁺-независимого связывания с молекулой кальмодулина и образования комплекса кальмодулин-пептидный фактор, который, связываясь с каталитической субъединицей фермента, вызывает его активацию (от 30 до 100% для КЛЦМ скелетной мышцы и от 80 до 100% и более для КЛЦМ гладкой мускулатуры). С учетом этих данных представлялось целесообразным изучить воздействие синтетических пептидов на активность КЛЦМ.

Исследования показали, что синтетические пептиды, также как ПФ₁₋₅ вызывают Са²⁺-независимое активирование КЛЦМ гладкой мускулатуры от 80 до 100% (таблица), причем для проявления их

активирующего действия необходимо, как и в случае ПФ₁₋₅ обязательное наличие кальмодулина в инкубационной среде. Этот факт свидетельствовал о том, что механизм действия синтетических пептидов аналогичен механизму действия ПФ₁₋₅ на активность КЛЦМ: происходит Ca²⁺-независимое связывание пептидов с молекулой кальмодулина и образование активного комплекса кальмодулин-пептид. В данном случае синтетические пептиды, как и ПФ₁₋₅ выполняют по-видимому, функцию ионов кальция.

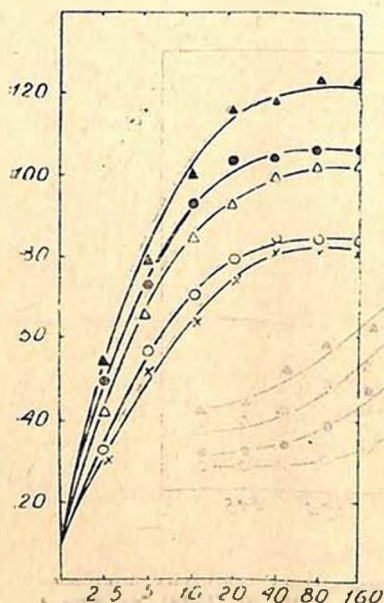


Рис. 2. Ca²⁺-независимое активирование киназы легких цепей миозина (КЛЦМ) под воздействием пептидных факторов гипоталамуса (ПФ₃-1; ПФ₄-2) и синтетических пептидов (П₃-3; П₄-4; П₂-5). По оси абсцисс — концентрации пептидов в нМ, по оси ординат — относительная активность КЛЦМ в %. За 100%-ную активность фермента принимали такое его количество, которое вызывало в течение 25 мин при 25° фосфорилирование легких цепей миозина на 50%.

Было изучено также воздействие различных концентраций П₂, П₃, П₄ и ПФ₃, ПФ₄ на активность КЛЦМ (рис. 2). Оказалось, что концентрации, необходимые для полумаксимальной активации КЛЦМ равны 3,9, 3,2, 2,7, 3,0, 2,6 нМ для П₂, П₃, П₄, ПФ₃, ПФ₄ соответственно. Полученные данные позволили заключить, что и в данном случае синтетические и нативные пептиды обладают почти одинаковой активностью.

Как было сказано выше, ПФ₁₋₅ (в концентрации 0,1 мкг/мл) стимулировали сокращение изолированной аорты кролика в K⁺-деполяризующем растворе, содержащем 40 мМ KCl от 20 до 25%. ПФ₁₋₅ в той же дозе стимулировали также процесс агрегации тромбоцитов, вызванный 5 мкМ ADP от 25 до 30% [2, 3]. Проведенные эксперименты показали, что синтетические пептиды (в дозе 0,1 мкг/мл) стимулировали процесс сокращения изолированной аорты кролика в K⁺-деполяризующем растворе (рис. 4) и процесс агре-

гадий тромбоцитов, вызванный 5 мкМ ADP (рис. 5) почти в той же степени, что и ПФ₁₋₅. Известно, что такие антагонисты кальмодулина, как W-7 и его структурные аналоги в условиях *in vitro* ингибируют процесс агрегации тромбоцитов и обеспечивают релаксацию гладкой мускулатуры путем Ca^{2+} -зависимого связывания с кальмодулином, что в свою очередь ингибирует активность Ca^{2+} -кальмодулинзависимых систем и, в частности, активность КЛЦМ [21]. Синтетические пептиды, как и ПФ₁₋₅ стимулируют эти процессы, по-видимому, также путем связывания с молекулой кальмодулина, но Ca^{2+} -независимым способом, являясь, по существу, эндогенными замещателями Ca^{2+} .

Таблица

Активирование киназы легких цепей миозина (КЛЦМ), выделенной из гладкой мускулатуры желудка кур, под воздействием коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса (ПФ) и синаптических пептидов (П₁, П₂, П₃, П₄)

Соединения	Относительная активность, %
Ca^{2+}	0
Ca^{2+} + кальмодулин	100
Ca^{2+} + ПФ _{1, 2, 3, 4, 5}	0
ЭГГА + кальмодулин	0
ЭГГА + кальмодулин + ПФ ₁	100
ЭГГА + кальмодулин + ПФ ₂	80
ЭГГА + кальмодулин + ПФ ₃	100
ЭГГА + кальмодулин + ПФ ₄	100
ЭГГА + кальмодулин + ПФ ₅	85
Ca^{2+} + П _{1, 2, 3, 4}	0
ЭГГА + кальмодулин + П ₁	80
ЭГГА + кальмодулин + П ₂	90
ЭГГА + кальмодулин + П ₃	85
ЭГГА + кальмодулин + П ₄	100

Примечание. Исследуемые соединения использовали в следующих концентрациях: кальмодулин—4,5 мкМ, CaCl_2 —0,1 мМ, ЭГГА—1 мМ, КЛЦМ—1,5 мкМ, ПФ₁₋₆—0,05 мкМ, П₁₋₄—0,05 мкМ. За 100%-ную активность фермента принимали такое количество КЛЦМ, которое вызывало в течение 25 мин при 25° фосфорилирование легких цепей миозина на 50%.

Таким образом, изучение воздействия синтетических пептидов на тест-системы, специфичные для нативных ПФ₁₋₅, показало, что синтетические пептиды обладают всеми свойствами нативных ПФ₁₋₅: активность синтетических пептидов во всех рассмотренных тестах была близка к активности нативных коронаросуживающих пептидов, а механизм их действия аналогичен механизму действия ПФ₁₋₅: Полученные результаты подтвердили наше предположение о том, что остальные два коронаросуживающих ПФ с невыясненной пока структурой также являются фрагментами β-цепи гемоглобина, отличающимися от структуры вышеуказанных коронаросуживающих ПФ лишь длиной пептидной цепи, и не исключено, что они представляют собой фрагменты 32—39 и 32—41 β-цепи гемоглобина.

Существует ли ПФ в условиях *in vivo* или они—артефакт и образуются в результате частичного аутолиза в ходе очистки. Мы

полагаем, что ПФ₁₋₅ существуют *in vivo* поскольку: 1—различное время хранения гипоталамуса в незамороженном состоянии после забоя животных (от 1 до 6 ч) не изменило существенно состав основных пиков в профиле хроматограмм после последней стадии очистки с использованием метода ВЭЖХ; 2—одни и те же пептиды были получены при использовании различных модификаций методов очистки. На примере проопиомеланокортина, который является предшественником β -липотропина, эндорфинов, β -МСГ, показано, что природа предпочитает синтезировать пептиды с разной биологической активностью в составе общего предшественника, из которого затем они образуются в результате ограниченного протеолиза. В частности, показано, что эндорфины образуются из β -липотропина под воздействием внутриклеточной протеиназы [22—24]. В этом случае ограни-

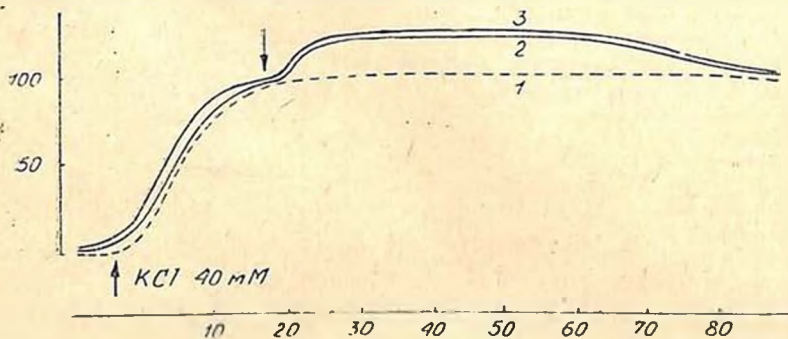


Рис. 3. Влияние пептидного фактора гипоталамуса (ПФ₃—3) и синтетического пептида (ПЗ—2) на сократительную способность изолированной аорты кролика в К⁺-деполяризующем растворе. По оси ординат—степень сокращения аорты в %. Максимальное сокращение, вызываемое 40 мМ KCl, принимали за 100%. Воздействие пептидов исследовали при достижении максимума сокращения. 1—контроль, не содержащий пептидов

ченный протеолиз приводит к образованию соединений с новыми биологическими свойствами. Тот факт, что фрагмент 32—41 β -цепи гемоглобина содержит пептиды с разной биологической активностью (геморфины и коронаросуживающие ПФ), свидетельствует о том, что эти пептиды могут синтезироваться в мозгу в составе общего предшественника—гемоглобинподобного белка и затем образоваться в результате ограниченного протеолиза этого белка при различных физиологических и патологических состояниях организма.

С другой стороны, поскольку гипоталамус принадлежит к тем участкам головного мозга [25—27], где ГЭБ наиболее уязвим и возможен свободный обмен биологически активными пептидами и гормонами между нервными окончаниями и кровью, не исключена возможность, что именно гемоглобин является предшественником этих пептидов, которые могут образоваться в результате его ограниче-

ного протеолиза также при различных физиологических и патологических состояниях организма и затем проникнуть в первые клетки гипоталамуса и принять участие в метаболических процессах нервной клетки.

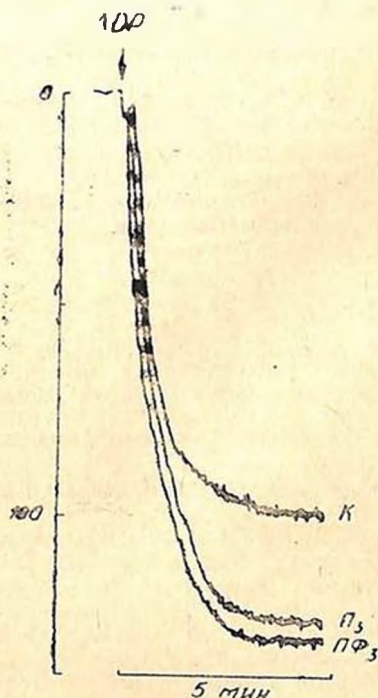


Рис. 4. Влияние коронаросуживающего пептидного фактора (P_3) и синтетического пептида (P_2) на степень агрегации тромбоцитов, вызванной 5 мкМ ADP. К—контроль, не содержащий пептидов. Тромбоциты были преинкубированы с пептидами (0,1 мкг/мл) при 37° в течение 3 мин в кювете агрегометра до стимуляции, вызванной 5 мкМ ADP. По оси ординат—степень агрегации тромбоцитов в %

Высказанные нами две различные точки зрения для объяснения присутствия P_{1-5} в ткани гипоталамуса являются лишь нашими предположениями и для четкого ответа на этот вопрос требуется проведение углубленных исследований в этом направлении.

HEMOGLOBIN, THE PRECURSOR OF CORONARO-CONSTRICTORY PEPTIDE FACTORS

BARKHUDARYAN N. A., *KELLERMANN J., *LOTTSPREICH F.,
GALOYAN A. A.

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

*Max-Planck Institute of Biochemistry, Munich

The properties of synthetic peptides—VVYPWT, LVVYPWT, LVVYP-WTQ, LVVYPWTQRF (obtained by solid phase peptide synthesis on the basis of the revealed primary structure of hypothalamic coronarospasmic peptide factors) were investigated. It was established that 3 of coronaro-constrictory peptide factors represent fragments 33—37, 33—38, 32—38 of the β -chain of hemoglobin. Using test systems specific

For native coronaro-constrictory peptide factors the identity of the properties of synthetic peptides and native coronaro-constrictory peptide factors was established. The possibility of the formation of the hypothalamic coronaro-constrictory peptides in vivo are discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.
2. Бархударян Н. А., Закарян Т. Р., Шувалова Л. А., Чацлян С. Г., Алексанян А. Р., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 8, № 4, с. 485—491, 1989.
3. Barkhudaryan N., Zatoryan T., Aleksanyan A., Sharova N., Shuvatorova L., Chailyan S., Galoyan A. 8th ESN Meeting, Leipzig, p. 21, 1990.
4. Закарян Т. Р., Бархударян Н. А., Шувалова Л. А., Островская М. В., Шарова Н. П., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 9, № 4, с. 444—449, 1990.
5. Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А., Овади Ю. Нейрохимия, т. 9, № 2, с. 188—195, 1990.
6. Horvath L., Barkhudaryan N., Galoyan A., O'adi J. 20th Meeting FEBS, Budapest, Hungary, p. 27, 1990.
7. Horvath L., Barkhudaryan N., Galoyan A., O'adi J. FEBS Lett. v. 276, № 1, 2, p. 197—200, 1990.
8. Barkhudaryan N., Oberthurr W., Lottspeich F., Galoyan A. Neurochemical Res., 1991 (in press).
9. Vogel W. M., Dennis R. C., Cassidy G., Apstein C. S., Valeri C. R. Ann. J. Physiol., v. 251, p. H413—H420, 1986.
10. Vogel W. M., L., Hsia J. C., Briggs L., Er S. S., Cassidy G., Apstein C. S., Valeri C. R. Life Sci., v. 41, p. 89—93, 1987.
11. Chang R. C., Huang W. Y., Redding T. W., Arimura A. A., Coy D. H., Shally A. V. Biochim. et biophys. acta, v. 625, p. 256—273, 1980.
12. Brantl V., Gramsch C., Lottspeich F., Mertz R., Jaeger K.—H., Herz A. Eur. J. Pharmacol., v. 125, p. 309—310, 1986.
13. Meierhofer J. M., Waki E. P., Hermer T. J., Lambros R. C., Makofske C.—D., Chang R. C. Int. J. Pept. Res. v. 13, p. 35—39, 1979.
14. Van Eldik L. J., Watterson D. M.—In: Calcium Physiology (ed. Marme D)—Springer Berlin, p. 215—226, 1984.
15. Dabrowska R., Aromatorio D., Sherry J. M. F., Hartshorne D. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 78, p. 1263—1277, 1977.
16. Dabrowska R., Sherry J. M. F., Aromatorio D., Hartshorne D. J. Biochemistry, v. 17, p. 253—258, 1978.
17. Perrie W. T., Perry S. V. Biochem. J., v. 119, p. 31—38, 1979.
18. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr L. A., Randall C. I. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1971.
19. Kanamori M., Naka M., Asano M., Hidaka H. J. Pharmac. Exper. Therap., v. 217, p. 494—499, 1981.
20. Born G. V. R. Nature, v. 194, p. 927—929, 1962.
21. Hidaka H., Asano M., Tanaka T. Mol. Pharmacol., v. 20, p. 571—578, 1981.
22. Graf L., Kenessey A. FEBS Lett., v. 69, p. 255—260, 1976.
23. Graf L., Kenessey A., Berzetei I., Ronai A. Biochim. Biophys. Res. Commun., v. 78, p. 1114—1123, 1977.
24. Graf L., Kenessey A., Putty A., Grynbaum A., Mark N., Lajtha A. Arch. Biochem. et biophys., v. 193, p. 101—109, 1979.
25. Bouchaud C., Bosler O. Int. Rev. Cytol., v. 105, p. 283—327, 1986.
26. Leonhardt H. In: Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen (ed. A. Oksche), p. 177—606, Springer-Verlag, 1980.
27. Risau W., Wolburg H. TINS, v. 13, p. 174—178, 1990.

Поступила 20. I. 1991

НОВЫЕ ДАННЫЕ О СВЯЗЫВАНИИ КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ ГИПОТАЛАМУСА С КАЛЬМОДУЛИНОМ

БАРХУДАРЯН Н. А., *ОРОС Ф., *ЛИЛИОМ К., БАРСЕГЯН К. С.,
*ОВАДИ Ю., ГАЛОЯН А. А.

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

*Институт энзимологии ВАН, Будапешт

Используя метод ферментзависимого иммуносорбентного анализа (ELISA), изучили взаимодействие коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса (ПФ₁₋₅) с N- и C-концевыми триптических фрагментами кальмодулина (1—77 и 78—148). Обнаружено, что ПФ₁₋₅ связываются (аналогично трифторперазину и меллитину) как с N-, так и с C-концевыми доменами кальмодулина, обладая, однако, более высоким сродством к N-концевому домену. Определение величины кажущейся K_d для комплексов кальмодулин—ПФ (K_d —2—10 нМ), N-концевой фрагмент кальмодулина—ПФ (K_d —15—100 нМ), C-концевой фрагмент кальмодулина—ПФ (K_d —300—1000 нМ) показало, что ПФ₁₋₅ обладают наибольшим сродством к лативной молекуле кальмодулина. Этот факт позволил сделать предположение о существовании внутримолекулярного взаимодействия между N- и C-концевыми доменами кальмодулина при его связывании с ПФ₁₋₅. ПФ₁₋₅ являются, по-видимому, аллостерическими регуляторами кальмодулина, приводя его структуру в зависимости от своей концентрации в различные конформационные состояния.

Известно, что кальмодулин способен связывать различные соединения, отличающиеся как по структуре, так и по фармакологическим свойствам. К их числу относятся такие лекарственные соединения, как производные фенотиазина (трифторперазин, хлорпромазин и др.) [1, 2], некоторые алкалоиды (винбластин, винкристин) [3], антибиотики (адреаминин) [4]. Связывание этих веществ, так называемых антагонистов кальмодулина, препятствует его взаимодействию с различными кальмодулинзависимыми ферментами [5, 6] или модифицирует это взаимодействие [7].

Показано также, что кальмодулин способен Ca^{2+} -зависимым способом связывать некоторые биологически активные пептиды и белки (АКТГ, β -эндорфин, вещество Р, гистоны, основной белок миелина и др.) [8—11]. Все эти соединения, в зависимости от их структуры, связываются с кальмодулином преимущественно через гидрофобные или ионные взаимодействия [12—13]. Хотя в настоящее время детально изучена структура кальмодулина и некоторых его антагонистов, нет достаточных знаний о механизмах взаимодействия каль-

модулина с его антагонистами. Тем не менее известно, например, что классический антагонист кальмодулина—трифторперазин (ТФП), а также меллитин (токсин, выделенный из пчелиного яда и состоящий из 26 аминокислотных остатков) связываются как с N-, так и с C-концевыми доменами кальмодулина [14, 15].

Ранее мы сообщили, что коропаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса (ПФ₁₋₅) [16] вызывают Ca²⁺-независимую активацию некоторых Ca²⁺-кальмодулинзависимых ферментов (киназа легких цепей миозина (КЛЦМ), кальмодулинчувствительная ФДЭ сАМР) путем Ca²⁺-независимого связывания с кальмодулином [17—19], что было показано с помощью метода непрямого ELISA [19]. Оказалось, что ПФ₁₋₅ ингибируют образование комплекса кальмодулин-антитело путем связывания с кальмодулином как в присутствии, так и в отсутствие Ca²⁺. На основании экспериментальных данных нами была выдвинута следующая гипотеза: связывание ПФ с кальмодулином вызывает конформационные изменения в его антигенном участке, расположенном в C-концевом домене кальмодулина (последовательность аминокислот 137—143) [19] в результате чего теряется чувствительность кальмодулина к антителам, что приводит к ингибированию образования иммунокомплекса.

В данной работе была предпринята попытка для получения более точных данных о связывании ПФ₁₋₅ с кальмодулином. С этой целью, используя метод Drabikowski и соавт. [20], согласно которому в присутствии Ca²⁺ трипсин расщепляет кальмодулин на два больших фрагмента (1—77 и 78—148), изучили воздействие ПФ₁₋₅ на N- и C-концевые триптические фрагменты кальмодулина.

Материалы и методы

ПФ₁₋₅ выделяли по методу Галояна и соавт. [16] из гипоталамуса быка. Кальмодулин очищали из бычьего мозга до гомогенного состояния, используя аффинную хроматографию на трифторперазин-сефарозе-4В по методу Charbonneau и соавт. [21]. Кролики были иммунизированы 1-фтор-2,4-динитробензоатным производным бычьего кальмодулина по методу Wallace и соавт. [22]. Иммуноглобулиновую фракцию получали из антисыворотки с помощью хроматографии на QAE-Сефарексе А-50 по методу Tijssen и соавт. [23]. Моноспецифические антитела против бычьего кальмодулина были получены с помощью аффинной хроматографии на кальмодулин-сефарозе-4В. Иммуноглобулиновая фракция была проведена несколько раз через колонку с кальмодулин-сефарозой, затем колонку промыли 0,05 М трис-солевым буфером, pH 8,0. Антитела элюировали с колонки 0,2 М глицин-HCl буфером, pH 2,7 и сразу же нейтрализовали 0,2 М трис-HCl буфером, pH 8,0. Затем антитела диализовали против Na-бикарбонатного буфера, pH 9,6 и хранили при 4° в присутствии 0,2%-ного NaN₃.

Для определения образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело использовали метод непрямого ферментзависимого иммуносор-

бентного анализа (ELISA) [24]. Кальмодулин (в концентрации 2,5 мкг/мл) был иммобилизован на платах при 4° в течение 18 ч. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл и платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. В экспериментах по определению влияния ПФ на образование иммунного комплекса ПФ вносили в лунки плат вместе с антителами. Использовали различные концентрации ПФ (от 0,8 мкМ до 1,6 нМ). Анти-IgG, конъюгированный с пероксидазой хрена вносили в лунки плат в разведении 1:1000 и платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Через 60 мин после добавления субстрата (H_2O_2 и *o*-фенилендиамина), содержащее лунок фиксировали добавлением 2 н. H_2SO_4 и измеряли поглощение при 492 нм.

Гидролиз кальмодулина (2 мг/мл) трипсином был проведен по методу Drabikowski и соавт. [20] в присутствии 0,1 М $CaCl_2$. N- и C-концевые фрагменты кальмодулина были выделены из гидролизата в гомогенном виде по методу Guepin и соавт. [25] с использованием ВЭЖХ в обращенной фазе на колонке LiChrosorb 5 RP-18 (0,4×25 см, диаметр частиц 5 мкм, «Bio Separation Technologies», Венгрия). Элюцию проводили 10 мМ $(NH_4)_2CO_3$ с использованием линейного градиента ацетонитрила от 10 до 40%. Скорость элюции—1 мл/мин. Время изменения градиента—20 мин. Поглощение измеряли при 214 нм. Фрагменты кальмодулина были лиофилизированы и хранились при—20°.

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

Результаты и обсуждение

С помощью метода Drabikowski и соавт. [20] был проведен ограниченный гидролиз кальмодулина в присутствии 0,1 М $CaCl_2$, приведший к образованию двух больших фрагментов (1—77 и 78—148), которые затем были выделены в гомогенном состоянии с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе. Как видно из рис. 1, после 60 мин ограниченного гидролиза трипсином кальмодулин полностью распадается на 2 фрагмента. Время удерживания С-концевого фрагмента 15,5 мин, N-концевого фрагмента—17,4 мин, а время удерживания кальмодулина—17,8 мин. N- и С-концевые фрагменты кальмодулина были лиофилизированы и их гомогенность была проверена при электрофорезе в ПААГ (12,5%) в присутствии 8 М мочевины.

Была поставлена следующая задача: связываются ли ПФ с N- и С-концевыми фрагментами кальмодулина. Для этой цели было решено использовать метод непрямого ELISA, с помощью которого ранее мы установили факт связывания ПФ с интактной молекулой кальмодулина [17—19].

Как указывалось выше, ТФП и меллитин связываются как с N-, так и с С-концевыми фрагментами кальмодулина [14, 15]. Было целесообразно использовать метод непрямого ELISA и для демонстрации связывания ТФП и меллитина с N- и С-концевыми фрагментами кальмодулина с целью сравнительного анализа полученных данных.

В первой серии экспериментов было изучено воздействие ТФП на процесс связывания антител с иммобилизованным, на платах в одном случае intactным кальмодулином, в другом—С-концевым фрагментом кальмодулина, а в третьем—смесью N- и С-концевых триптических фрагментов.

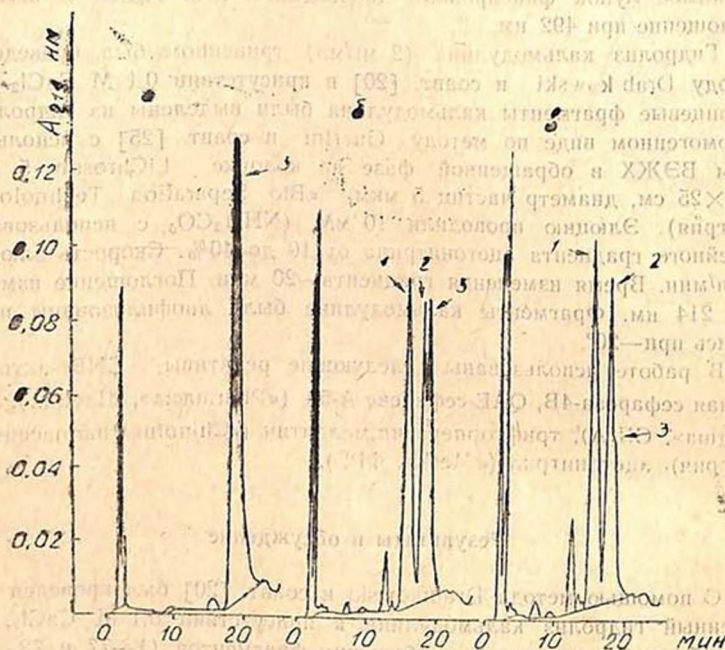


Рис. 1. Очистка N- и С-концевых фрагментов кальмодулина с помощью ВЭЖХ в обращенной фазе из колонки LiChrosorb 5 RP-18 (0,4×25 см), с использованием градиента концентрации ацетонитрила 10—40%, содержащего 10 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Скорость элюции 1 мл/мин. Время изменения градиента—20 мин. а—а—ВЭЖХ триптического гидролизата кальмодулина через 0, 30 и 60 мин гидролиза соответственно. Пики были идентифицированы как кальмодулин (3), его N-(2) и С-концевой (1) фрагменты

Необходимо отметить, что образование иммунореактивного комплекса не регистрировалось в случае, когда на платах был иммобилизован N-концевой фрагмент кальмодулина, так как он не содержал антигенного участка. Как видно из рис. 2, ТФП при низких концентрациях (максимальный эффект наблюдается при концентрации 3,9 мкМ) стимулировал образование иммунореактивного комплекса, а при высоких концентрациях около

500 мкМ) вызывал значительное ингибирование образования иммунокомплекса. Этот факт свидетельствовал о четко выраженном дозовом эффекте ТФП на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Нами было высказано предположение, что при высоких концентрациях ТФП связывается с С-концевым доменом

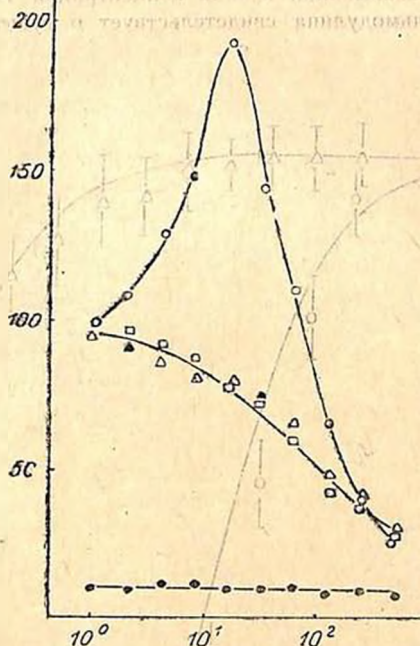


Рис. 2. Влияние трифторперазина (ТФП) на образование иммунокомплекса. Кальмодулин (о-о) был иммобилизован на платах в концентрации 2,5 мкг/мл, его С- (Δ-) и N-концевой (⊖-) фрагменты были иммобилизованы на платах в концентрации 3,6 мкг/мл. —□—) иммобилизация на платах смеси N- и С-концевых фрагментов кальмодулина. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. По оси абсцисс — концентрация ТФА в мкМ; по оси ординат — % образования иммунокомплекса

кальмодулина (где расположен антигенный участок кальмодулина — последовательность аминокислот 137—143 [26]), вызывая такие конформационные изменения в его молекуле, которые приводят к потере сродства кальмодулина к антителам, а при низких концентрациях ТФП, по-видимому, связывается с N-концевым доменом кальмодулина, вызывая другие конформационные изменения в его молекуле, которые приводят к повышению сродства кальмодулина к антителам.

Как видно из рис. 2, когда на платах был иммобилизован С-концевой фрагмент кальмодулина или смесь триптических фрагментов, ТФП терял способность стимулировать образование иммунокомплекса.

Это свидетельствует о следующем: 1) предположение о том, что ТФП при низких концентрациях связывается с N-концевым доменом, что приводит к повышению сродства кальмодулина к антителам, не лишено оснований; 2) для проявления стимулирующего эффекта ТФП на образование иммунного комплекса необходимо наличие нативной структуры кальмодулина; 3) повышение сродства кальмодулина к антителам при связывании низких концентраций ТФП с N-концевым фрагментом кальмодулина свидетельствует о существовании внутри-

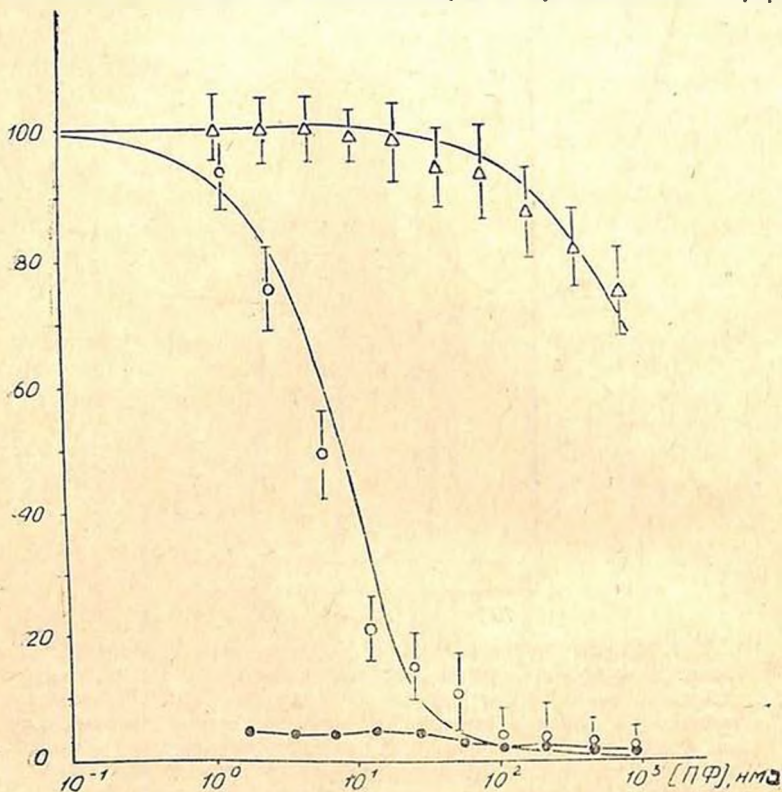


Рис. 3. Влияние пептидного фактора (ПФ₁) на образование иммунного комплекса. Кальмодулин был иммобилизован на платах в концентрации 2,5 мкг/мл (— $\circ$ —), его С- (— Δ —) и N-концевой () фрагменты были иммобилизованы в концентрации 3,6 мкг/мл. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. По оси абсцисс—концентрация ПФ₁ в нМ; по оси ординат—% образования иммунного комплекса.

молекулярного взаимодействия между N- и С-концевыми доменами нативного кальмодулина, поскольку присоединение ТФП к N-концевому домену, очевидно, вызывает определенные конформационные изменения в его С-концевом домене, где расположен антигенный участок молекулы кальмодулина.

Во второй серии экспериментов аналогичные исследования были проведены с ПФ₁₋₅. Как видно из рис. 3, когда на платах был иммобилизован кальмодулин, под воздействием ПФ происходит значительное (более чем на 90%) ингибирование образования иммунного комплекса. Когда же на платах иммобилизован С-концевой триптический фрагмент кальмодулина, наблюдается ингибирование образования иммунного комплекса лишь на 30%. Полученные данные свидетельствовали о необходимости наличия нативной структуры кальмодулина для его эффективного связывания с ПФ. В то же время эти данные косвенно указывали на то, что N-концевой домен кальмодулина также принимает участие в связывании ПФ. На рис. 3 приведены данные относительно ПФ₁. Тот же эффект был получен при использовании других ПФ.

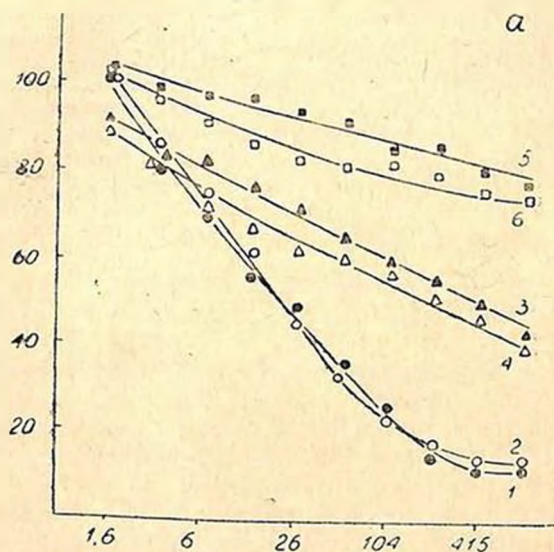


Рис. 4. а влияние пептидных факторов (ПФ₁ и ПФ₂) на образование иммунного комплекса кальмодулин-антитело в отсутствие и в присутствии в инкубационной смеси N-концевого фрагмента (НФ) кальмодулина. 1—ПФ₁; 2—ПФ₂; 3—ПФ₁+0,05 мкМ НФ; 4—ПФ₂+0,05 мкМ НФ; 5—ПФ₁+3,2 мкМ НФ; 6—ПФ₂+3,2 мкМ НФ. По оси абсцисс—концентрация ПФ в нМ; по оси ординат—% связывания антитела с кальмодулином.

Как указывалось выше, в случае, иммобилизации на платах N-концевого фрагмента кальмодулина, из-за отсутствия в его структуре антигенного участка образование иммунного комплекса не регистрировалось. Поэтому для выяснения вопроса связываются ли ПФ с N-концевым доменом были проведены следующие эксперименты. В инкубационную смесь вместе с антителами вносили N-концевой триптический фрагмент кальмодулина (были использованы 2 постоянные концентрации N-концевого фрагмента—0,05 мкМ и

3,2 мкМ/ и ПФ (в диапазоне концентраций от 1,6 нМ до 0,08 мкМ). Как видно из рис. 4, а добавление в инкубационную смесь N-концевого фрагмента в концентрации 0,05 мкМ приводило к снижению ингибиторного эффекта ПФ на процесс образования иммунокомплекса на 30%. Добавление же в инкубационную смесь N-концевого фрагмента в концентрации 3,2 мкМ приводило к снижению ингибиторного эффекта ПФ на 70%. Как видно из того же рисунка в случае, когда инкубационная смесь не содержала N-концевого фрагмента, под воздействием ПФ происходило ингибирование образования иммунокомплекса до 90%.

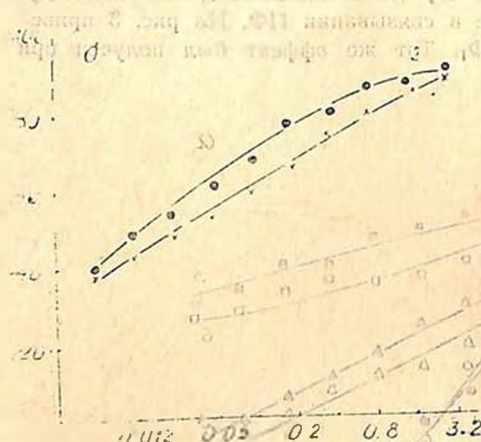


Рис. 4, б. Влияние различных концентраций N-концевого фрагмента кальмодулина на образование иммунокомплекса в присутствии постоянных концентраций пептидных факторов (ПФ₁ и ПФ₂). 1—ПФ₁ (50 нМ); 2—ПФ₂ (50 нМ). По оси абсцисс—концентрация N-концевого фрагмента в мкМ; по оси ординат—% связывания антител с кальмодулином.

В других экспериментах в инкубационную смесь вместе с антителами добавляли различные концентрации N-концевого фрагмента при постоянной концентрации ПФ (50 нМ). Эта концентрация ПФ в значительной степени (до 60%) подавляла образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Как видно из рис. 4, б с повышением концентрации N-концевого фрагмента происходило снижение ингибиторного эффекта ПФ на процесс образования иммунокомплекса.

Полученные данные однозначно указывали на связывание ПФ с N-концевым фрагментом кальмодулина, что приводило к образованию комплекса N-концевой, фрагмент—ПФ и резкому уменьшению концентрации несвязанных ПФ в инкубационной смеси. Это, в свою очередь, в значительной степени уменьшало возможность образования комплекса кальмодулин—ПФ и приводило к тому, что иммобилизованный на платах кальмодулин становился более доступным для антител.

С помощью нелинейного регрессионного анализа данных, полученных методом непрямого ELISA, были определены величины K_d для комплексов, образуемых ПФ с кальмодулином и его N- и C-концевыми фрагментами. Для комплексов кальмодулин-ПФ и C-концевой

фрагмент кальмодулина—ПФ величина K_d была определена по формуле:

$$K_d = C_{SD} (qS_{Ag} - qS_D - pS_{Ab}) / S_D \quad (1)$$

где C_{SD} и S_D — это концентрация ПФ в инкубационной смеси и концентрация ПФ, связанного с твердой фазой соответственно; q — число эпитопов на молекулу кальмодулина; p — число эпитопов, связанных с молекулой антитела; S_{Ag} — концентрация кальмодулина или его С-концевого фрагмента, связанных с твердой фазой; S_{Ab} — концентрация антител, связанных с твердой фазой.

При определении величины K_d для вышеуказанных комплексов были учтены и следующие параметры:

$$C_0 = C_s + (F/V) S_{Ab} \quad (2)$$

$$D_0 = C_{SD} + (F/V) S_D \quad (3)$$

где C_0 — общая концентрация антител; C_s — концентрация антител в растворе; D_0 — общая концентрация ПФ; F — реакционная площадь; V — объем реакционной смеси.

При определении величины K_d для комплекса N-концевой фрагмент-ПФ было использовано иное выражение, характеризующее общую концентрацию ПФ (D_0):

$$D_0 = C_{SD} + (C_{SD} - N) + (F/V) [(qS_D - qS_{Ag}) + (qS_{Ag} - qS_D - pS_{Ab})] \quad (4)$$

где N — это концевой фрагмент кальмодулина.

Вышеприведенные формулы (1—4) были выведены на основе работ Nuygen и соавт. [27—29].

Итак, согласно полученным данным, величины K_d для комплексов кальмодулин-ПФ, N-концевой фрагмент кальмодулина-ПФ и С-концевой фрагмент кальмодулина-ПФ были равны 2—10 нМ; 5—100 нМ; 300—1000 нМ соответственно. Как видно, ПФ₁₋₅ обладают наибольшим сродством к интактной молекуле кальмодулина, что позволяет высказать предположение о существовании внутримолекулярного взаимодействия между N- и С-концевыми доменами кальмодулина при его связывании с ПФ.

В третьей серии экспериментов было подтверждено связывание меллитина как с N-, так и с С-концевым фрагментом кальмодулина. Как видно из рис. 5 меллитин ингибирует образование иммунокомплекса как в случае иммобилизации на платах кальмодулина, так и в случае иммобилизации на платах его С-концевого фрагмента. Добавление же в инкубационную смесь N-концевого фрагмента (как и в случае ПФ₁₋₅) приводит к нейтрализации ингибиторного эффекта меллитина на процесс образования иммунокомплекса.

При сравнении данных, представленных на рисунках 2, 3, 5, можно заметить, что ПФ₁₋₅ ингибируют образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело в концентрации на три порядка меньшей, чем ТФП и на два порядка меньшей, чем меллитин.

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что ПФ₁₋₅ связываются как с N-, так и с C-концевыми доменами кальмодулина, что типично для таких известных антагонистов кальмодулина, как ТФП и меллитин [14, 15]. Недавно установленная нами первичная структура для 3-х из ПФ₁₋₅ (VVVURW; VVURWT; LVVURWT) [30] дала достаточно оснований высказать мнение о том, что эти пептиды связываются с кальмодулином преимущественно через гидрофобные взаимодействия, что также типично для многих антагонистов кальмодулина.

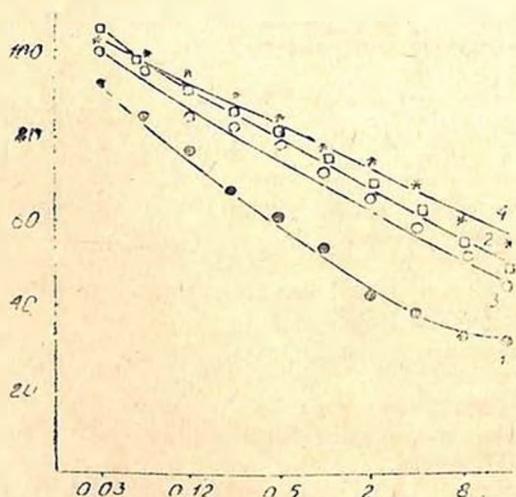


Рис. 5. Влияние меллитина на образование иммунного комплекса в отсутствие в окислительной смеси — концевой фрагмента кальмодулина (НФ). Кальмодулин был иммобилизован на платах в концентрации 2,5 мкг/мл, а его C-кислотный фрагмент (3) — в концентрации — 3,6 мкг/мл. Антигена вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. 2 — 1 + 3,2 мкМ НФ; 4 — 3 + 3,2 мкМ НФ. По оси абсцисс — концентрация меллитина в мкМ; по оси ординат — % образования иммунного комплекса

Полученные результаты представляют для нас особую ценность, так как они дали возможность объяснить обнаруженный нами дозозависимый эффект ПФ₁₋₅ на активность КЛЦМ (ПФ₁₋₅ в концентрации 10^{-9} — 10^{-7} М вызывают Ca^{2+} -независимую активацию КЛЦМ, а при концентрации 10^{-6} М и выше этот эффект не наблюдается). Мы думаем, что можно следующим образом объяснить это явление: поскольку ПФ₁₋₅ обладают более высоким сродством к N-концевому фрагменту кальмодулина, то, по-видимому, при концентрации 10^{-9} — 10^{-7} М ПФ₁₋₅ связываются с N-концевым доменом кальмодулина и вызывают такие конформационные изменения в молекуле кальмодулина, которые приводят к активации КЛЦМ. При концентрации 10^{-6} М и выше ПФ₁₋₅ по-видимому, связываются после-

довательно с N-, и с C-концевыми доменами кальмодулина и вызывают другие конформационные изменения кальмодулина, при которых он уже не способен активировать фермент.

Вышеизложенное позволяет нам еще раз высказать мнение о существовании внутримолекулярного взаимодействия между N- и C-концевыми доменами кальмодулина при его связывании с PF_{1-5} , которые, вероятно, можно причислить к аллостерическим регуляторам кальмодулина.

NEW DATA ON BINDING HYPOTHALAMIC CORONARO-CONSTRICTORY PEPTIDE FACTORS WITH CALMODULIN

HARKHODARYAN N. A., *OROSZ F., *LILIO M. K., BARSEGIAN K. S.,
OVADI J., GALOYAN A. A.

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

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

Using the technique of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) the interaction of coronaro-constrictory peptide factors (PF_{1-5}) with two main fragments of calmodulin obtained by limited trypsin digestion (1—77 and 78—148) was investigated. It was found that PF_{1-5} bound with N- as with C-terminal domain of calmodulin demonstrating higher affinity to N-terminal domain. The determination of K_d for calmodulin—PF (K_d 2—10 nM), N-terminal fragment—PF (K_d 15—100 nM), C-terminal fragment—PF (K_d 30—100 nM) complexes has revealed that PF_{1-5} show higher affinity to intact calmodulin. This fact lets us make a suggestion about the existence of interactions between N- and C-terminal domains within the native calmodulin structure, when PF_{1-5} bind with calmodulin. The problem of allosteric regulation of calmodulin by PF_{1-5} is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Levin R. M., Weiss B. *Mol. Pharmacol.*, v. 13, p. 690—697, 1977.
2. Reid R. E., Garlepp J., Hodges R. S. *FEBS Lett.*, v. 154, p. 60—64, 1983.
3. Gietzen K., Wurica Bader H., *Mol. Pharmacol.*, v. 22, p. 413—419, 1982.
4. Poutogian B. D., Minocherhomjee A. M., Al-Jobori A. *Can. Biochem. Cell Biol.*, v. 61, p. 927—933, 1983.
5. Prozialek W. G., Weiss B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 222, p. 509—516, 1982.
6. Weiss B., Prozialek W., Cimino M. *Adv. Cycl. Nucl. Res.*, v. 12, p. 213—225, 1980.
7. Orosz F., Christova T. Y., Ovadi J. *Mol. pharmacol.*, v. 33, p. 678—682, 1988.
8. Malenich D. A., Anderson S. R. *Biochemistry*, v. 21, p. 3450—3456, 1982.
9. Malenich D. A., Anderson S. R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 114, p. 50—53, 1983.

19. Grand R. J. A., Perry S. V. *Biochem. J.*, v. 181, p. 227-240, 1980.
11. Fello S., Bello H., Granados F. *Biochemistry*, v. 21, p. 451-465, 1982.
12. Giedroc D. P., Puett D., Ling N., Stalos J. V. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 16-22, 1983.
13. Maulet Y., Cox J. A. *Biochemistry*, v. 22, p. 5680-5685, 1983.
14. Levin R. M., Weiss B. J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 208, p. 454-459, 1979.
15. Steiner R. F., Marshall L. and Needleman P. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 246, p. 286-300, 1986.
16. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р. *Нейрохимия*, т. 7, № 4, с. 519-524, 1988.
17. Barkhudaryan N., Zakaryan T., Aicksanyan A., Sharova N., Shatalova L., Chalyan S., Gal'oyan A. 8th ESN Meeting, Leipzig, p. 214, 1990.
18. Horvath L., Barkhudaryan N., Galoyan A., Ozadi J. *FEBS Lett.*, v. 276, p. 197-200, 1990.
19. Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А. А., Овади Ю. *Нейрохимия*, т. 9, № 2, с. 190-197, 1990.
20. Drabikowski W., Kurnichi J., Grabarak Z. *Biochim. et biophys. acta*, v. 485, p. 124-133, 1977.
21. Charbonneau U., and Cormier M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 90, p. 1039-1047, 1979.
22. Wallace R. W., Chung W. Y. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 6564-6571, 1979.
23. Tijssen P., Kurstak E. In: *Viral Immunodiagnosis* (Kurstak E. and Morisset R., eds.), p. 125. Academic Press, New York, 1974.
24. Van Eldik L. J., Watterson D. M. In: *Calcium and Cell Physiology* (Marme D., ed.), p. 215-226, Springer Berlin, 1984.
25. Guerini D., Krebs J., Carafoli E. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 15172-15177, 1984.
26. Ovadi J. *Prog. Drug. Res.*, v. 33, p. 353-395, 1989.
27. Nygren H., Stenberg M. *J. Immunol. Methods*, v. 80, p. 15-21, 1985.
28. Nygren H., Karttinen M., Stenberg M. *J. Immunol. Methods*, v. 92, p. 219-224, 1986.
29. Stenberg M., Stibler L., Nygren H. *J. Theor. Biol.*, v. 120, p. 129-138, 1986.
30. Закарян Т. Р., Бархударян Н. А., Шувалова Л. А., Остовская М. В., Шарова Н. П., Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 9, № 4, с. 44-449, 1990.

Поступила 25. I. 1991

АЧУТ АЧУТ ВЧ

УДК 577.152.1.274

СНИЖЕНИЕ КОЛИЧЕСТВА КРЕАТИНФОСФОКИНАЗЫ МОЗГА ПРИ ШИЗОФРЕНИИ, ВЫЯВЛЯЕМОЕ МЕТОДОМ ДВУМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ВОДОРАСТВОРИМЫХ БЕЛКОВ

КЛЮШНИК Т. И., СПУНДЭ А. Я., ЯКОВЛЕВ А. Г.

Всесоюзный научный центр психического здоровья АМН СССР, Москва

Анализ двумерных белковых карт водорастворимых экстрактов постмортального мозга больных шизофренией выявил значительное снижение количества белка с молекулярной М_r 40 кД и ИЭТ 5,1—5,2 по сравнению с контрольными образцами мозга. После препаративного выделения этого белка из водорастворимого экстракта ткани мозга он был идентифицирован как мозговой изофермент креатинфосфокиназы (КФК ВВ). Снижение количества КФК ВВ в водорастворимых экстрактах мозга при шизофрении подтверждено методом иммуноэлектроблоттинга с использованием специфических для КФК ВВ антител.

Выяснение биологических причин психических расстройств человека является одной из важнейших задач нейробиологии, поскольку эта область способна не только расширить сферу знаний о механизмах психической деятельности, но и указать новые и эффективные пути профилактики и терапии ее нарушений. С развитием арсенала методов молекулярной биологии возможность решения этой задачи становится реальной, в особенности в случае заболеваний с выраженной наследственной природой.

Одним из методических подходов при поиске биологических нарушений, связанных с развитием сложных наследственных заболеваний, является сравнительный анализ белкового спектра идентичных тканей больных и здоровых индивидов.

В этой работе, используя высокоэффективную процедуру двумерного электрофоретического фракционирования водных белковых экстрактов, проведен сравнительный анализ белковых карт отделов постмортального мозга здоровых и страдавших шизофренией индивидов.

Материалы и методы

Материалом для анализа служили различные отделы постмортального головного мозга человека. Были использованы образцы мозга 29 человек, не страдавших психическими заболеваниями и умерших от острой сердечно-сосудистой недостаточности и 25 больных шизофренией (прогредиентная и приступообразно-прогредиент-

ная), умерших в терминальной стадии этого заболевания от острой сердечно-сосудистой недостаточности или пневмонии. Аутопсию мозга в обеих группах проводили не позже 7—8 ч после смерти.

Ткань гомогенизировали в 10 объемах 50 мМ калий-фосфатного буфера, pH 7,0 (КФБ) в гомогенизаторе «Виртис». Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 100000 g 4°. Супернатант лиофилизировали и использовали для анализа двумерным электрофорезом по методу O'Farrell [1]. Для приготовления образцов для изоэлектрофокусирования 100 мкг лиофилизата растворяли в 25 мкл диссоциирующего буфера, содержащего 8 М мочевины, 1%-ный Nonidet P-40, 2%-ные амфолины (pH 3—10, pH 3,5—5, pH 4—6, pH 5—7 в соотношении 3:3:1:3) и 1 мМ дитиотреитол. Фокусирование проводили в 5%-ном ПААГ, содержащем 8 М мочевины, 1%-ный Nonidet P-40 и амфолины как в диссоциирующем буфере. Электрофорез во втором направлении проводили в 12%-ном ПААГ. Белки в геле окрашивали раствором 0,1%-ного Кумасси R 250 в 25%-ном метаноле, 10%-ной уксусной кислоте.

Препаративное выделение белка Р-40 проводили на системе FPLC («Pharmacia»). Все стадии выделения проводились при 4°. На колонку размером 4,0 × 20 см, заполненную смолой DEAE-Toyo Perl 650 M («Toyo Soda», Япония) и уравновешенную буфером А (50 мМ K_2HPO_4 , pH 7,0, 1 мМ дитиотреитол), наносили 100 г водорастворимого экстракта мозга человека, приготовленного, как описано ранее. Элюцию осуществляли 0—0,4 М градиентом концентрации KCl. Фракцию, элюирующуюся 0,1—0,25 М KCl, высаливали сульфатом аммония (40—60% насыщения), осадок растворяли в 10 мл буфера А. Для гель-фильтрации использовали колонку 2,6 × 100 см, наполненную смолой Toyo Perl 55SF и уравновешенную буфером А. Фракцию, обогащенную Р-40, наносили на колонку Mono Q HR5/5 («Pharmacia», Швеция). Элюцию вели 0,1—2,0 М градиентом KCl. Белки, элюируемые 0,1—0,15 М KCl, после концентрирования на ультрафильтрах PM 10 («Amicon», США), фракционировали на колонке «Superose 12 HR 10/30» («Pharmacia», Швеция).

Белковый состав полученных фракций контролировали методом электрофореза [2] с использованием электрофоретической системы Phast System («Pharmacia», Швеция).

Измерение креатинфосфокиназной активности проводили с использованием набора «NAC-activated CPK tests» («KONE», Finland).

Для получения специфических антител против креатинфосфокиназы ВВ (КФК ВВ) человека кроликов иммунизировали внутривенным введением 200 мкг очищенного по методу Miller [3] препарата КФК ВВ в смеси с адъювантом Фрейнда (1/1) с интервалом 2 недели в течение 2-х месяцев (первая инъекция—с полным адъювантом, последующие—с неполным). Забор крови проводили через 7—10 дней после последней инъекции.

Иммуноэлектрофорез проводили по методу Towbin [4]. После переноса нитроцеллюлозный фильтр инкубировали в 10%-ной фе-

тальной сыворотке телянка в течение 1 ч при 37°, промывали 100 мМ трис-HCl, pH 7,5, содержащим 150 мМ NaCl и 2%-ный Твин-20 (промывающий буфер) и инкубировали в течение 1 ч при 37° с анти-сывороткой к КФК ВВ в разведении 1/250. После промывания (3 раза по 10 мин) промывающим буфером фильтр помещали на 1 ч при 37° в раствор козьих антител против IgG кролика, конъюгированных с пероксидазой хрена. Для проявления реакции использовали 0,05%-ный раствор 3,3'-диаминобензидина, содержащий 0,15%-ный H_2O_2 .

Результаты исследования

Для сравнительного анализа белков мозга человека в норме и при шизофрении в этой работе использованы водные белковые экстракты различных областей коры больших полушарий мозга, а также ядер таламуса, коры мозжечка и продолговатого мозга. Белковые карты, полученные методом двумерного электрофореза, отражают специфические особенности различных отделов мозга [5, 6].

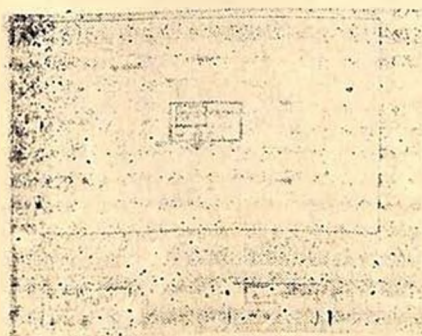


Рис. 1. Двумерная электрофореграмма водорастворимого экстракта лобной коры постмортального мозга человека. Фрагмент двумерной электрофореграммы контрольного образца мозга (а), образца мозга больного шизофренией (б). Рамкой внутри фрагмента выделен белок Р-40

Вместе с тем, сравнивая двумерные карты белков отделов постмортального мозга больных шизофренией с соответствующими контрольными картами, практически для всех исследованных отделов мозга были выявлены некоторые, главным образом, количественные отличия, по-видимому, характерные для шизофрении. Рис. 1 демонстрирует двумерные карты водорастворимых белковых экстрактов лобной коры постмортального мозга, типичные для контрольной группы людей, не страдавших психическими заболеваниями, и группы больных шизофренией. Анализ этих карт позволяет отметить наиболее существенное снижение интенсивности окрашивания одного из хорошо разрешаемых белков с величиной M_r 40 кД и pH 5,1—5,2 в случае шизофрении по сравнению с контролем. Условно этот белок был обозначен как Р-40.

Снижение содержания в водорастворимых белковых экстрактах мозга белка Р-40 было выявлено в 21 из 25 исследованных образцов лобной коры больных шизофренией. Из 28 контрольных образцов аналогичное снижение интенсивности окрашивания соответствующего пятна наблюдали лишь в двух случаях. Следует отметить, что содержание Р-40 в водорастворимых экстрактах мозга человека в исследованной выборке не зависит ни от половых, ни от возрастных отличий доноров. Стабильное снижение его содержания в экстрактах мозга больных свидетельствует также об отсутствии связи этого явления со специфическими формами течения заболевания и его лекарственной терапии. Поскольку при шизофрении количество Р-40 пропорционально резко снижено во всех исследованных нами отделах мозга, этот процесс не является локализованным.

Сопоставление полученных нами двумерных электрофореграмм с опубликованными белковыми картами мозга [7, 8] не позволило идентифицировать белок Р-40, хотя соответствующее ему пятно также присутствует на опубликованных картах. Сопоставление проводили на основе идентификации характерных маркерных белков, таких как актин, тубулин, альбумин, глобулиновый фибриллярный кислый белок и др.

С целью идентификации Р-40 был препаративно выделен из тканей мозга человека. В процессе его очистки мы исходили из известных значений величины M_r и ИЭТ, определенных по результатам двумерного электрофореза. Контролем в процессе очистки служило сравнение полипептидного состава фракций из тестированных ранее двумерным электрофорезом контрольного мозга и мозга больного шизофренией. Сравнение проводили методом электрофореза в ПААГ, содержащем ДДС-Na. Этапы выделения белка Р-40 описаны в разделе «Материалы и методы». На рис. 2 приведены электрофореграммы промежуточных белковых фракций, а также очищенного белка. Идентичность выделенного белка белку Р-40 была подтверждена сопоставлением их положения на двумерной белковой карте.

Результаты нативного электрофореза Р-40 свидетельствуют о его субъединичном строении, поскольку в этих условиях белок мигрирует гомогенной зоной, соответствующей M_r 76 кД (данные не представлены). Учитывая, что величина M_r Р-40 по результатам электрофореза в присутствии ДДС-Na была определена как 40 кД, нативный белок, очевидно, является димером, состоящим из двух идентичных субъединиц.

В дополнительных исследованиях периферических тканей человека методом двумерного электрофореза водных белковых экстрактов было показано, что Р-40 не обнаруживается в печени, почках и сыворотке крови, но представлен, хотя и в меньших количествах, чем в мозгу, в ткани сердечной мышцы.

Среди изученных белков мозга с известными физико-химическими параметрами сходными характеристиками обладает мозговая изо-

форма креатинфосфокиназы. Этот фермент состоит из двух идентичных субъединиц (ВВ) с величиной $M_r \sim 40$ кД. Известно также, что креатинфосфокиназа обнаруживается в сердце, но в форме гетеродимера (КФК МВ) [9, 10].

Идентичность белка Р-40 и В-изоформы креатинфосфокиназы была доказана на основании иммунореакции Р-40 с антителами против КФК ВВ. Кроме того, наличие креатинфосфокиназной активности у гомогенного препарата Р-40 было подтверждено с помощью специфического энзиматического анализа.

На рис. 3 представлены результаты стандартной процедуры иммуноблоттинга, где фракционированные в электрофорезе в присутст-

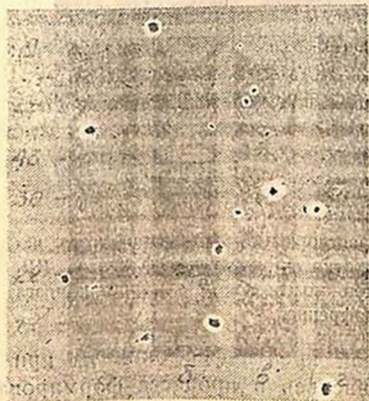


Рис. 2. Электрофореграммы промежуточных фракций, полученных при выделении белка Р-40. а—водорастворимый экстракт мозга человека, б—элюат 0,1—0,25 М KCl с ДЭАЭ Toyo Perl 650 M, в—элюат 0,15 М KCl с Менз Q HR5/5. г—очищенный препарат белка Р-40

вии ДДС-На белки водных экстрактов мозга больных шизофренией и контрольных индивидов окрашивали антителами против КФК ВВ. Результаты этих исследований подтверждают выявленное двумерным электрофорезом снижение концентрации КФК ВВ в водных экстрактах мозга при шизофрении.

Результаты и обсуждение

Поиск белковых маркеров психических заболеваний представляется важной областью исследований в биологической психиатрии, поскольку может открыть возможность определения ключевых биохимических механизмов, определяющих вероятность развития заболевания. Одним из наиболее мощных при поиске белкового полиморфизма инструментом является метод двумерного электрофореза и составления белковых карт исследуемых тканей. Применительно к психическим заболеваниям человека этот метод уже использовался для сопоставления карт тотальных экстрактов белков мозга больных с картами здоровых индивидов [11, 12].

В этой работе с помощью двумерного электрофореза фракции водорастворимых белков продемонстрировано значительное умень-

шение в отделах мозга индивидов, страдавших шизофренией, количества одного из важнейших ферментов энергетического обмена в мозгу—цитозольной креатинфосфокиназы. Этот белок, как известно, состоит из двух субъединиц, характеризующихся тканевой специфичностью, и катализирует обратимое фосфорилирование креатина, играя важную роль в регуляции концентрации АТФ в клетке.

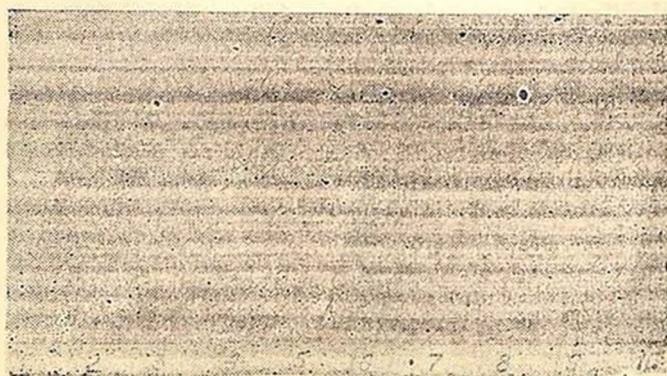


Рис. 3. Иммуноэлектроблоттинг водорастворимых экстрактов мозга человека с использованием антисыворотки к креатинфосфокиназе ВВ. 1—5—экстракты контрольных образцов мозга; 6—10—экстракты мозга больных шизофренией

Снижение количества цитозольной креатинфосфокиназы при шизофрении может явиться одним из звеньев в процессе формирования энергетического дефицита при этом заболевании [13]. Причины снижения концентрации цитозольной КФК в мозгу при шизофрении пока не ясны и в дальнейшем предстоит выяснить, связано ли это явление с измененной активностью кодирующего ее гена или с процессами модификации белка в клетке, приводящими к деградации или перераспределению КФК в субклеточных фракциях.

DECREASE OF CREATIN PHOSPHOKINASE BB CONTENT IN WATER-SOLUBLE FRACTION OF SCHIZOPHRENIC BRAINS REVEALED BY TWO-DIMENSIONAL ELECTROPHORESIS

KIJUSHNIK T. P., SPUNDE A. Y., YAKOVLEV A. G.

All-Union Research Center of Mental Health, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

Analysis of water-soluble extracts from postmortem schizophrenic brains by two-dimensional electrophoresis reveals significant decrease of protein with M_r 40 kD and pI 5,1—5,2 comparing with normal brains. This protein was identified as creatin phosphokinase BB (CPK BB). Reduction of CPK BB amount in water-soluble extracts from schizophrenic brains was confirmed by immunoblotting with antibody to CPK BB.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. O'Farrell P. H. J. Biol. Chem., v. 250, p. 4007—4021, 1975.
2. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—685, 1970.
3. Miller J., Wei R. Clin. Biochem., v. 13, p. 14—19, 1985.
4. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA), v. 76, p. 4350—4355, 1979.
5. Klushnik T., Burbac a G., Aka'ov I. Neurochemistry international, v. 1, suppl. 1, p. 139, 1988.
6. Jacobowitz D. M., Heydorn W. E. Clin. Chem., v. 30(12), p. 1996—2002, 1984.
7. Comings D. E. Clin. Chem., v. 28/4, p. 782—789, 1982.
8. Narayan R. K., Heydorn W. E., Creed G. J., Kornblith P. L. Clin. Chem., v. 30(12), p. 1989—1995, 1984.
9. Nea'ou D. A. Clin. Chem. Acta, v. 166(1), p. 73—78, 1987.
10. Сакс В. А. Успехи биологической химии, т. XXIV, с. 40—64, 1983.
11. Perrett C. W., Whatley S. A. Biochem. Soc. Trans., v. 15, p. 546, 1987.
12. Comings D. E. Clin. Chem., v. 28/4, p. 793—804, 1982.
13. Pclar D. Schizophrenia Bull., v. 14, № 2, p. 255—269.

Поступила 4. XII 1990

УДК: 616.89—008.441.13:612.82.04.46:577.42

ПРИМЕНЕНИЕ СТИМУЛЯТОРОВ СИНТЕЗА БЕЛКОВ ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ И МЕТАБОЛИЗМА МОЗГА, ВЫЗВАННЫХ ПРЕНАТАЛЬНОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИЕЙ

МАИЗЕЛИС М. Я., ЗАБЛУДОВСКИЙ А. Л., ШИХОВ С. Н.

НИИ психиатрии МЗ РСФСР, Москва

Исследовано влияние кофакторов и предшественников синтеза нуклеиновых кислот и белков, вводимых в раннем постнатальном периоде крысам, подвергавшимся пренатальной алкоголизации, на поведенческие реакции и показатели белкового метаболизма в возрасте 3-х месяцев. У подопытных крыс наблюдали изменения двигательной активности и других показателей поведения по тесту «открытого поля», улучшение сохранения условного рефлекса пассивного избегания. Наряду с этим, при исследовании включения меченых аминокислот в белки мозга отмечена существенная активация синтеза суммарных, водорастворимых и водонерастворимых белков в ряде структур мозга. Было изменено также удельное содержание суммарных белков и их фракций в отделах мозга. Результаты опытов указывают на эффективность применения стимуляторов синтеза нуклеиновых кислот и белков для компенсации нарушений функции и метаболизма мозга в результате воздействия этанола в антенатальном периоде.

Многочисленные клинические наблюдения и экспериментальные исследования свидетельствуют о патогенном влиянии этанола, потребляемого во время беременности, на физическое и психическое развитие потомства [1—3]. В ряде работ показаны нарушения поведения, обучения и памяти под влиянием пренатальной алкоголизации [4—6]. Нашими исследованиями [7—9] установлено, что для животных, перенесших пренатальное воздействие этанола, наряду с особенностями поведения и условнорефлекторной деятельности, характерно угнетение синтеза белков в структурах мозга. Последнее может являться одной из причин функциональной патологии ЦНС [10, 11]. Исходя из этого, важной практической задачей представляется разработка способов коррекции указанных нарушений. С этой целью мы применили для экспериментальной терапии пренатально алкоголизированных животных в раннем постнатальном периоде комплекс препаратов, обладающих стимулирующим влиянием на синтез белков—кофакторы и предшественники синтеза нуклеиновых кислот и белков: оротовую, фолиевую кислоты и витамин В₁₂.

Материалы и методы

Крысам-самкам с 5-го по 20-й день беременности вводили зондом в желудок 40%-ный раствор этанола (5 г/кг). С 5-го по 30-й день после рождения крысам из разных пометов вводили желудочным зондом раствор оротата (12,5 мг/кг), фолата (25 мг/кг) и подкожно—витамины В₁₂ (12,5 мкг/кг), животным контрольной группы—воду и физиологический раствор в равных объемах. В 2—2,5-месячном возрасте исследовали поведенческие реакции по тесту «открытого поля», выработку и сохранение условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) и чувствительность к аудиогенному раздражителю.

При исследовании синтеза белков мозга определяли интенсивность включения (удельную радиоактивность) меченых аминокислот [³H]лейцин и [³⁵S]метионин), вводимых внутривентрикулярно за 2 ч до декапитации, в суммарные белки и их водорастворимую и нерастворимую фракции отдельных структур мозга. Счет радиоактивности проводили на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Rackbeta» («ЛКВ», Италия). Содержание белков в мозгу определяли по методу Lowry.

Результаты исследований обрабатывали статистически по критериям Стьюдента и Вилкоксона-Манна-Уитни. В опытах использованы целинные крысы-самки.

Результаты и обсуждение

Исследования поведенческих реакций по методике «открытого поля» в условиях умеренной освещенности не выявили существенных различий (по сравнению с контролем) горизонтальной и вертикальной двигательной активности у крыс, получавших стимуляторы как по суммарным показателям, так и в отдельные периоды наблюдения. Наряду с этим отмечено снижение исследовательской активности, число болюсов при дефекации было уменьшено ($p < 0,05$) почти в 2 раза (рис. 1). Анализ соотношения двигательных и других реакций в I и II периодах наблюдения выявил существенное снижение угашения вертикальной и исследовательской активности в ходе опыта у пренатально алкоголизированных крыс. У животных, получавших стимуляторы, эти показатели имели тенденцию к нормализации. Угашение реакций группинга и дефекации, которое у алкоголизированных крыс было более высоким, чем в контроле, у опытных животных приближалось к норме (табл. 1).

В условиях стресса (при ярком освещении) наблюдали угнетение всех видов двигательной активности по сравнению с опытом, проведенным при умеренном освещении. Наиболее выраженные изменения отмечены у алкоголизированных животных. Крысы, получавшие стимуляторы, по всем показателям мало отличались от контрольных (рис. 1). Аналогичная закономерность выявлена и при анализе угашения реакций, которое по многим видам активности резко возрастало у алкоголизированных крыс и приближалось к значениям контроля у животных, подвергавшихся терапии (табл. 1).

По показателям выработки УРПИ (время пребывания в освещенном отсеке, число ударов током) крысы, получавшие стимуляторы, не отличались от контроля. При проверке сохранения рефлекса у этой группы животных время пребывания в освещенном отсеке было несколько выше, чем у контрольных. Число крыс, обучившихся до

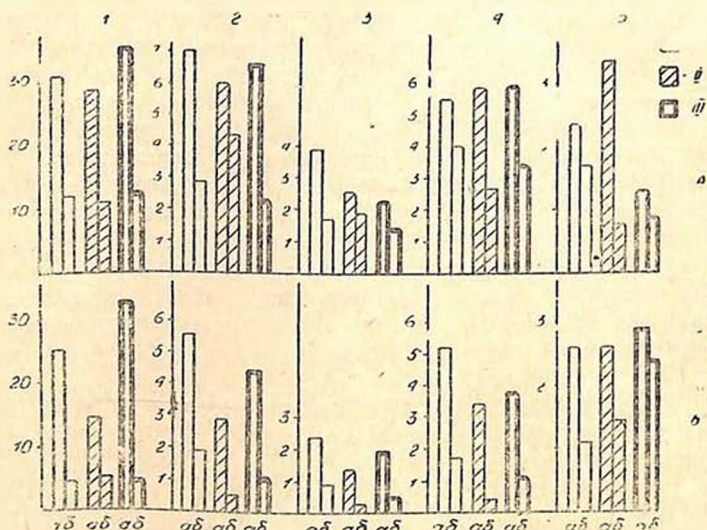


Рис. 1. Показатели поведения крыс в «открытом поле» (число реакций). А—рассеянный; В—яркий свет; 1—горизонтальная двигательная активность, 2—вертикальная двигательная активность, 3—исследовательская активность, 4—реакции груминга, 5—болусы при дефекации; а б—I и II периоды сессии наблюдения соответственно, I—контроль, II—алкоголь, III—алкоголь+стимуляторы

Показатели угашения* поведенческих реакций в «открытом поле» у крыс-самцов

Группы животных**	Двигательная активность		Исследовательская активность	Груминг	Дефекации
	горизонтальная	вертикальная			

Умеренное освещение

I (n=12)	-63,5±9,7	-58,2±9,9	-44,4±19,9	-19,2±17,1	-15,1±21,1
II (n=5)	-67,8±13,3	-42,0±17,7	-26,2±35,5	-47,8±14,3	-70,3±20,3
III (n=13)	-67,1±8,1	-60,4±9,3	-50,8±15,4	-30,8±7,7	-29,6±23,4

яркий свет

I (n=12)	-77,5±5,5	-55,0±18,3	-43,1±18,1	-39,6±20,4	-52,1±13,1
II (n=5)	-72,2±17,1	-80,6±12,2	-51,0±22,5	-78,6±13,8	-68,3±31,8
III (n=13)	-79,3±6,7	-61,3±12,8	-39,0±17,2	-51,4±11,2	-28,7±12,2

Примечание. *Показатель угашения— $(A_2-A_1)/(A_1+A_2) \times 100$, где A_1 и A_2 —число реакций соответственно в I и II периодах наблюдения. **Здесь и в табл. 2. I—контроль, II—алкоголь, III—алкоголь + стимуляторы.

заданного критерия, в опытной группе также превышало значение контроля (табл. 2).

При исследовании чувствительности к аудиогенному раздражителю судорожных реакций не отмечено ни в одной из групп. У отдельных животных наблюдали двигательное возбуждение: в конг-роле—у одной крысы, у двух, подвергавшихся действию этанола, а в группе животных, получавших стимуляторы—у одной.

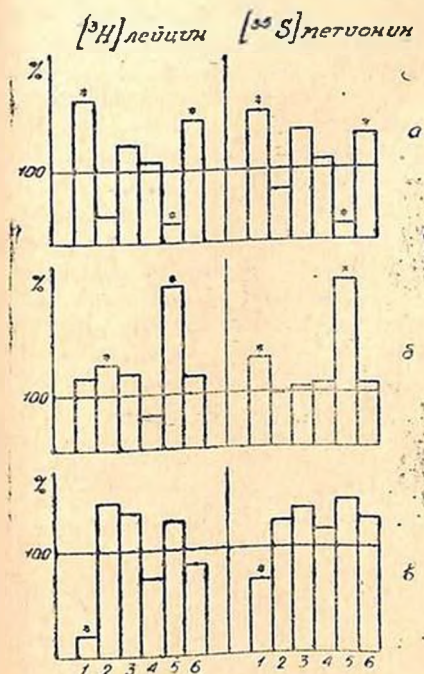


Рис. 2. Изменения включения меченых аминокислот в белки разных отделов головного мозга крыс, получавших стимуляторы синтеза белков в раннем постнатальном периоде (в % к контролю). 1—исокортекс, 2—гиппокамп, 3—стриатум, 4—мозжечок, 5—ствол, 6—гипоталамус; а—суммарные, б—водорастворимые белки

Исследования белкового метаболизма в мозгу выявили у пренатально алкоголизированных крыс, получавших комплекс препаратов, изменения удельного содержания и синтеза белков в отделах мозга. У этих животных включение обеих меченых аминокислот в суммарные белки не только достигало значений контроля, но в большинстве исследованных структур было увеличено, особенно в коре полушарий и гипоталамусе. Наряду с этим в гиппокампе и стволе отмечено снижение включения предшественников. В водонерастворимой фракции величина У.А. белков во всех отделах мозга, кроме коры полушарий, приближалась к контролю или превышала его. Аналогичные изменения наблюдали в водорастворимой фракции белков, где резкая активация синтеза (на 60%) отмечена в продолговатом мозгу и в меньшей степени—в коре и гиппокампе (рис. 2).

Содержание суммарных белков и их фракций во многих отделах мозга у подопытных животных, получавших комплекс стимуляторов,

достигало уровня контроля или превышало его, однако в отдельных структурах (кора полушарий, стриатум) оно было снижено (рис. 3). Изменения удельного содержания белков в структурах мозга не

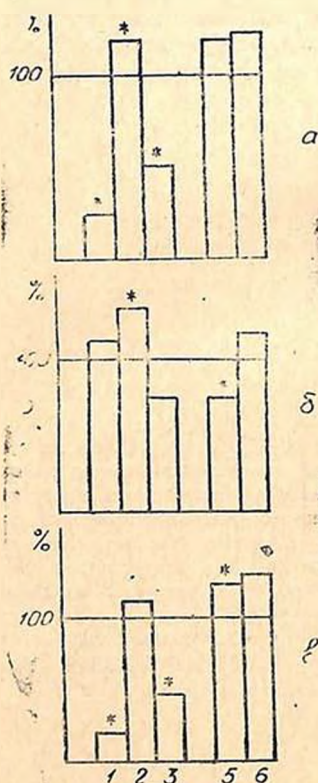


Рис. 3. Изменения удельного содержания белков в структурах мозга подопытных крыс. Обозначения, как на рис. 2

Таблица 2
Показатели условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ)
подопытных и контрольных крыс

Группы животных	Выработка УРПИ		Проверка сохранения УРПИ	
	время пребывания в освещенном отсеке (с)	число уда, оп токов	время пребывания в освещенном отсеке (с)	Доля обучившихся животных (%)
I (n=12)	15,5	2,8	127,0	67,0
II (n=11)	10,5	2,4	133,7	73,0
III (n=13)	14,5	2,8	145,4	77,0

всегда соответствовали показателям интенсивности включения меченых аминокислот в белки этих отделов.

Результаты опытов показывают, что применение комплекса сти-

муляторов синтеза белков в раннем постнатальном периоде способствует нормализации показателей белкового метаболизма в мозгу пренатально алкоголизированных животных. При этом весьма существенно, что отмеченные изменения, как и особенности поведенческих реакций, наблюдались у половозрелых крыс через 2 месяца после окончания курса применения препаратов. Наличие такого отставленного и длительного эффекта позволяет полагать, что использование стимуляторов белкового синтеза на ранних этапах постнатального онтогенеза отражается на становлении и последующем функционировании белоксинтезирующей системы мозга, нарушенной в результате пренатальной алкоголизации [7—9].

Полученные результаты соответствуют имеющимся в литературе экспериментальным данным о влиянии кофакторов синтеза и предшественников нуклеиновых кислот и белков на сохранение условного рефлекса [12, 13], особенно в условиях патологии при действии электрошока [14]. Имеются и клинические наблюдения, свидетельствующие об успешном использовании комплекса оротата, фолата и витамина В₁₂ для лечения детей с задержками психического развития и олигофренией. При этом отмечалось улучшение памяти, внимания, психомоторной функции, электрофизиологических показателей наряду с улучшением состояния больных [14].

В опытах на животных установлено, что применение комплекса оротата, фолата и витамина В₁₂ вызывает активацию синтеза РНК, изменение активности РНК-полимераз, лизосомных ферментов [14], синтеза белков в мозгу [15]. Сопоставление этих данных с приведенными выше подтверждает положение об участии процессов синтеза макромолекул в сохранении следов памяти [10, 11]. Поэтому имеются основания полагать, что в наших опытах особенности поведенческих реакций у подопытных крыс в определенной мере обусловлены изменением состояния белкового метаболизма в мозгу в результате воздействия стимуляторов на ранних этапах постнатального онтогенеза.

Результаты опытов указывают на целесообразность использования кофакторов и предшественников синтеза нуклеиновых кислот и белков для компенсации нарушений функций и белкового метаболизма в мозгу, вызванных пренатальной алкоголизацией.

USE OF PROTEINS SYNTHESIS STIMULANTS FOR EXPERIMENTAL THERAPY OF BRAIN FUNCTIONING AND METABOLISM DISTURBANCES INDUCED BY PRENATAL ALCOHOLISATION

MAIZEI IS M. Ya., ZABUDOVSKY A. I., SHIRFOV S. N.

Moscow Research Institute of Psychiatry

The effect of co-factors and precursors of nucleic acids and proteins synthesis, administered in early postnatal period to rat offsprings exposed to prenatal alcoholization, on behavior reactions and indices of pro-

tein metabolism has been examined. In 3-months-old experimental animals the changes in motor activity and other characteristics of behavior in the „open field“, an improvement in saving of the passive avoidance conditioned reflex have been noted. Along with in investigating the labeled aminoacids incorporation into brain protein we found out a considerable activation of synthesis of the total proteins in a number of brain structures. The specific content of total proteins and their fractions in brain areas was also changed. The results of the investigation suggest the efficiency of the use of proteins and nucleic acids synthesis stimulants in order to compensate the brain functions and metabolism disturbances induced by antenatal ethanol effect.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бадалян Л. О., Мاستюкова Е. М. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 86, № 10, с. 1448—1454, 1986.
2. Куниковская Л. С. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 80, № 3, с. 417—422, 1980.
3. Усова Е. В., Сазонова Н. С., Рассодина З. А. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 81, № 10, с. 1552, 1981.
4. Дульнев В. Д. Влияние хронического алкоголизма родителей на развитие нервной системы потомства. Автореф. канд. дис., М., 1964.
5. Смольникова Н. М. Фармакология и токсикология, № 6, с. 66—68, 1982.
6. Bond N. W., Di Galisto E. L. Psychopharmacol., v. 58, № 1, p. 69—71, 1978.
7. Майзелис М. Я., Заблудовский А. Л., Шихов С. Н. Нейрохимия, т. 2, № 3, с. 288—294, 1983.
8. Майзелис М. Я., Заблудовский А. Л., Шихов С. Н. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 83, № 3, с. 394—399, 1983.
9. Шихов С. Н. Особенности высшей нервной деятельности и синтеза белков в мозгу животных, перенесших внутриутробное воздействие этилола: Автореф. канд. дис., М., 1989.
10. Кругликов Р. И. Нейрохимические механизмы обучения и памяти, с. 211, М., Наука, 1981.
11. Hyden H., Lange P. W. Science, v. 159, № 3821, p. 1370—1373, 1968.
12. Дергачев В. В., Кругликов Р. И., Меерсон Ф. З. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 10, с. 10—13, 1967.
13. Меерсон Ф. З., Дергачев В. В., Кругликов Р. И. Материалы научной конф. «Вопросы физиол. и патол. нервной системы», с. 159—161, М., 1966.
14. Дергачев В. В. Молекулярные и клеточные механизмы памяти, М., 1977.
15. Кругликов Р. И., Майзелис М. Я., Заблудовский А. Л. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 27, вып. 6, с. 1296—1301, 1977.

Поступила 8. IV. 1991

УДК: 612.8.015—577.125.8

ВЛИЯНИЕ ГИПЕРВИТАМИНОЗА А НА МЕТАБОЛИЗМ
ЦЕРЕБРОЗИДОВ И СУЛЬФОЦЕРЕБРОЗИДОВ
ГОЛОВНОГО МОЗГА

ЧАЕВА Л. С., ФОМИЧЕВА Ю. В., ОПАРИНА Т. И.

Физиологический институт им. А. А. Ухтомского, Ленинград

В различных отделах головного мозга 3-недельных крыс (большие полушария, мозжечок, продолговатый мозг) определено содержание типичных гликолипидов: миелина—цереброзидов и сульфocereброзидов в норме и при гипервитаминозе А. В этих условиях соотношение фракций цереброзидов и сульфocereброзидов остается неизменным, несмотря на выявленное увеличение содержания гликолипидов в больших полушариях.

Проведено исследование метаболизма двух фракций цереброзидов и сульфocereброзидов с использованием $2[^{14}\text{C}]$ ацетата. Показано, что в больших полушариях и мозжечке удельная радиоактивность цереброзидов и сульфocereброзидов значительно выше, чем в продолговатом мозгу, что отражает различный уровень миелинизации в указанных отделах головного мозга 3-недельных крыс. Под влиянием избытка витамина А в организме наблюдалось отчетливое снижение включения радиоактивного предшественника для всех фракций гликолипидов исследованных отделов головного мозга, что можно расценить как одно из доказательств нарушения нормального процесса миелинизации.

Изучение метаболизма липидов НС продолжает привлекать внимание исследователей в связи с выяснением их роли в развитии демиелинизирующих заболеваний различной этиологии. Одним из возможных подходов к пониманию биохимических механизмов, вызывающих нарушение структуры миелина, является создание разного рода экспериментальных патологий: аллергического энцефаломиелита, гиперфенилаланинемии и др. [1—3]. В модельных экспериментах нарушение образования миелина достигается более эффективно на растущих животных. Именно в этот период еще несформировавшаяся НС особенно чувствительна к воздействию неблагоприятных факторов. В качестве таковых могут выступать некоторые биологически активные вещества, в частности высокие концентрации витамина А (ретинола).

Хорошо известны многообразные физиологические функции витамина А в организме, связанные с его участием в зрительном акте, поддержании процессов роста, контролем над дифференцировкой эпителиальных тканей. В литературе имеются данные о его влиянии на липидный обмен головного мозга, однако этот вопрос изучен недостаточно. Отмечается как угнетение метаболизма липидов миелина при

аномальных концентрациях витамина А в организме [4, 5], так и отсутствие такого воздействия [6]. Считают, что токсичность избытка витамина А обусловлена появлением в плазме крови свободного ретинола, не связанного с белком [7]. Высказывается предположение, что витамин А принимает участие в регуляции транспорта липидов от эндоплазматического ретикулума к миелиновым мембранам, оказывая влияние на уровень свободного тубулина в мозгу [8]. Данная работа посвящена выяснению влияния высоких доз витамина А на метаболизм церебролипидов (Ц) и сульфocereбролипидов (СЦ) различных отделов головного мозга крыс.

Материалы и методы

Опыты ставили на белых беспородных крысах в возрасте 10 дней. С целью вызвать экспериментальный гипervитаминизм А крысам вводили раствор ретинола ацетата в абрикосовом масле. За один прием животное получало 1000 МЕ витамина А; всего проводили по 4 приема через день по схеме, предложенной в нашей лаборатории [9]. Контрольным животным вводили абрикосовое масло. Раствор витамина А вводили крысам с помощью специального шприца с шариком на конце. Животных декапитировали на 6-й день после окончания введения витамина, то есть в возрасте 22 дней, что соответствует наиболее активному периоду миелинизации. Концентрацию витамина А определяли по реакции с ТФУ [10].

Для исследования интенсивности обмена Ц и СЦ в качестве радиоактивного предшественника использовали $2[^{14}\text{C}]$ ацетат в дозе 30 мкКи на 100 г массы тела (экспозиция 1 ч). После декапитации животного головной мозг промывали в физиологическом растворе, освобождали от кровеносных сосудов, отделяли большие полушария, мозжечок и продолговатый мозг.

Общие липиды из ткани мозга выделяли методом Folch и соавт. [11], ганглиозиды удаляли 0,1%-ным NaCl [12]. Ц и СЦ выделяли из промытого липидного экстракта методом ТСХ на силикагеле КСК в системе хлороформ-метанол-концентрированный аммиак (80:20:0,4). Способ выделения отдельных фракций гликолипидов описан ранее [13].

Определение суммарного содержания гликолипидов в липидном экстракте проводили методом Svennerholm [12]. Количественную оценку отдельных фракций Ц и СЦ осуществляли этим же методом в модификации Smith [14]. Радиоактивность фракций гликолипидов измеряли на сцинтилляционном счетчике типа «Beckman», (СИИА). Все использованные методы подробно изложены в методическом руководстве [15].

Результаты и обсуждение

О развитии состояния гипervитаминоза судили по концентрации ретинола и его эфиров в плазме крови, печени и нервной ткани. Используемый метод [10] позволяет определить в крови и тканях со-

держание витамина А и его производных, поскольку большая часть введенного витамина А (ретинол-ацетата) в стенке кишечника подвергается переэстерификации и разносится по организму в виде эфиров ретинола [16]. Экспериментальные данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Содержание витамина А в различных органах на 6-й день после введения ретинола ацетата (мг/г ткани)

Органы	n	Норма	Контроль	Витамин А
Плазма* крови	6	0.95 ± 0.15	0.94 ± 0.11	2.53 ± 0.39 $p^{**} < 0.01$
Печень	10	4.34 ± 0.31	4.48 ± 0.11	18.52 ± 1.91 $p < 0.001$
Головной мозг	7	0.55 ± 0.05	0.52 ± 0.0	0.90 ± 0.05 $p < 0.001$

Примечание * — содержание витамина А в плазме крови выражено в мг/дл.

** — достоверность различий во всех случаях рассчитана по отношению к контролю.

Полученные результаты свидетельствуют о резком повышении концентрации ретинола и его эфиров в плазме крови, печени и нервной ткани в 2,7; 4,1 и 1,7 раза соответственно в результате скормливания ретинола ацетата по нашей схеме. На основании этих данных можно сделать заключение о развитии состояния гипервитаминоза у подопытных животных.

Из различных отделов головного мозга крыс (большие полушария, мозжечок, продолговатый мозг) были получены экстракты общих липидов, в которых определено суммарное содержание Ц и СЦ. Результаты, полученные на 3-х группах животных, — норма (интактные), контрольные (введение абрикосового масла) и подопытные (гипервитаминоз А), приведены в табл. 2.

Таблица 2

Суммарное содержание цереброзидов и сульфocereброзидов (мг/г влажной ткани) в отделах головного мозга крыс в норме, контроле и при гипервитаминозе А (n=6)

Отделы мозга	Норма	Контроль	Опыт
Большие полушария	7.11 ± 0.58 $p > 0.05$	6.92 ± 0.64 $p < 0.05$	10.18 ± 1.17 $p < 0.05$
Мозжечок	12.90 ± 0.51 $p > 0.05$	13.17 ± 1.15 $p > 0.05$	13.52 ± 0.53 $p > 0.05$
Продолговатый мозг	15.52 ± 0.3 $p > 0.05$	13.94 ± 1.23 $p > 0.05$	17.11 ± 1.72 $p > 0.05$

Представленные данные свидетельствуют о том, что в норме отделы головного мозга 3-недельных крыс различаются по содержанию гликолипидов, что находится в соответствии с представлением о большей обогащенности миелином филогенетически более древних отделов ЦНС [17, 18].

Для всех отделов головного мозга не выявлено достоверных различий в содержании исследуемых гликолипидов между нормальными и контрольными группами животных. При гипервитаминозе А содержание гликолипидов существенно повысилось в больших полушариях (на 47%), а для мозжечка и продолговатого мозга эти изменения оказались статистически недостоверными ($p > 0,05$).

Из общих липидов указанных отделов головного мозга выделены СЦ и 2 фракции Ц (C_1 , C_2) со значениями R_f соответственно 0,34, 0,45 и 0,55. Как нами было показано ранее, фракции цереброзидов различаются по составу жирных кислот. Фракция C_1 в отличие от C_2 содержит преимущественно гидроксигирные кислоты [18]. Определено содержание этих фракций гликолипидов в различных отделах головного мозга в контроле и в условиях гипервитаминоза А.

Таблица 3

Содержание фракций цереброзидов и сульфocereброзидов (мг/г влажной ткани) в отделах головного мозга крыс в контроле и при гипервитаминозе А ($n=6$)

Отделы головного мозга	Условия опыта	Фракции цереброзидов		Сульфocereброзиды
		C_1	C_2	
Большие полушария	контроль	$3,36 \pm 0,27$	$2,02 \pm 0,16$	$1,46 \pm 0,11$
	опыт	$4,18 \pm 0,23$	$2,13 \pm 0,19$	$1,73 \pm 0,09$
Мозжечок	р	$< 0,05$	$> 0,05$	$< 0,05$
	контроль	$6,11 \pm 0,49$	$6,07 \pm 0,49$	$0,90 \pm 0,07$
Продолговатый мозг	опыт	$5,97 \pm 0,22$	$6,67 \pm 0,24$	$0,83 \pm 0,03$
	р	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$
	контроль	$6,95 \pm 0,56$	$5,44 \pm 0,43$	$1,97 \pm 0,16$
	опыт	$7,18 \pm 0,15$	$6,93 \pm 0,55$	$2,52 \pm 0,23$
	р	$> 0,05$	$> 0,05$	$> 0,05$

Как видно из данных, представленных в табл. 3, введение высокой дозы витамина А вызвало неоднозначный характер изменения содержания фракции Ц больших полушарий головного мозга растущих крыс. А именно, содержание фракции C_1 увеличилось на 24%, а фракции C_2 практически не изменялось. Количество СЦ в больших полушариях возросло на 18%. При другой исследованной нами модели демиелинизирующего заболевания—гиперфенилаланинемии фракция Ц с гидроксигирными кислотами также оказалась наиболее чувствительной к избытку фенилаланина в организме [3]. Вероятно, в период миелинизации, когда биосинтез Ц происходит наиболее активно, метаболические различия между цереброзидными фракциями выражены в большей степени. При исследовании биосинтеза Ц в опытах *in vitro* показано, что именно гидроксигирные кислоты являются предпочтительными в качестве субстрата реакции. При этом показано, что α -гидроксигирная кислота определяет скорость биосинтеза Ц [18]. В мозжечке и продолговатом мозгу не обнаружено

статистически достоверных изменений в содержании исследуемых гликофинголипидов при гипervитаминозе А.

В табл. 4 представлен расчет процентного соотношения фракций Ц и СЦ в различных отделах головного мозга.

В контроле в больших полушариях в наибольшем количестве присутствует фракция цереброзидов Ц₁, содержащая гидроксижирные кислоты, где на ее долю приходится свыше 50% суммарных гли-

Таблица 4

Процентное соотношение фракций цереброзидов и сульфocereброзидов в контроле и при гипervитаминозе А (n=6)

Отделы головного мозга	Условия опыта	Фракции: цереброзидов		Сульфocereброзиды
		Ц ₁	Ц ₂	
Большие полушария	контроль	53,6±2,3	22,1±1,4	22,5±1,8
	опыт	55,4±1,6 >0,05	20,5±2,3 >0,05	20,9±1,7 >0,05
Мозжечок	контроль	46,6±0,3	46,4±0,7	6,9±0,7
	опыт	41,3±2,7 >0,05	49,3±3,5 >0,05	6,2±0,5 >0,05
Продолговатый мозг	контроль	9,8±1,0	36,1±1,7	14,1±1,0
	опыт	43,6±1,3 >0,05	38,3±1,3 >0,05	16,0±2,5 >0,05

кофинголипидов. В мозжечке, по нашим данным, обе фракции Ц содержатся в одинаковом количестве, составляя в сумме свыше 90%. В то же время СЦ представлены в нем в наименьшем количестве и составляют не более 7% от общего содержания гликолипидов. Таким образом, отделы головного мозга характеризуются определенным соотношением фракций Ц и СЦ. При гипervитаминозе А это соотношение практически сохраняется во всех отделах мозга, в том числе и в больших полушариях, несмотря на увеличение абсолютного содержания гликолипидов в этом отделе.

Исследование влияния высоких доз витамина А на интенсивность включения радиоактивного 2[¹⁴C]ацетата в изучаемые гликофинголипиды представляло для нас особый интерес.

Из данных табл. 5 следует, что в контроле величина удельной радиоактивности (УР) фракции Ц₁ во всех отделах головного мозга была значительно выше по сравнению с фракцией Ц₂, причем для продолговатого мозга это различие было выражено наиболее резко. Следует также указать, что в больших полушариях и в мозжечке УР обеих фракций Ц и СЦ существенно выше, чем в продолговатом мозгу. На основании этих данных можно сделать вывод о значительно более интенсивном включении радиоактивного предшественника в Ц, содержащие гидроксигирные кислоты. Известно, что именно эти кислоты наряду с другими длинноцепочечными жирными кислотами (C₂₂—C₂₄) являются наиболее характерными для жирнокислотного

состава Ц. Вероятно, в период активной миелинизации значимость этих Ц в организации структуры миелина особенно велика. Кроме того, различный уровень метаболизма гликолипидов в исследуемых отделах головного мозга указывает на то, что у крыс в 3-недельном возрасте процесс миелинизации происходит наиболее интенсивно в больших полушариях и мозжечке, а в продолговатом мозгу миелинизация к этому периоду уже миновала пик своей активности [17].

Таблица 5

Удельная радиоактивность цереброзидов и сульфocereброзидов (имп/мин/мг) в отделах головного мозга в контроле и при гипервитаминозе А (n=6)

Отделы головного мозга	Условия опыта	Фракции цереброзидов		Сульфocereброзиды
		Ц ₁	Ц ₂	
Большие полушария	контроль	3457±319	2750±271	3693±327
	опыт	2313±235 <0.01	2182±118 <0.01	2584±168 <0.01
Мозжечок	контроль	3387±205	2231±145	4020±31
	опыт	1854±201 <0.01	1858±67 <0.05	2451±98 <0.001
Продолговатый мозг	контроль	2367±113	780±41	1240±118
	опыт	1767±191 <0.05	627±27 <0.01	81±63 <0.01

При гипервитаминозе А для всех фракций гликолипидов исследованных отделов головного мозга наблюдалось отчетливое снижение интенсивности включения радиоактивного $2[^{14}\text{C}]$ ацетата. В большей степени это характерно для фракции Ц₁ в больших полушариях и в мозжечке, где величина УР уменьшалась на 34—45%. УР фракции Ц₂ во всех отделах понизилась менее существенно (на 17—20%). Снижение УР сульфocereброзидов в исследованных отделах мозга составило 30—39%. Таким образом, нами получены результаты, указывающие на существенное снижение интенсивности включения радиоактивного предшественника в Ц и СЦ головного мозга при гипервитаминозе А. Следует указать, что величина УР гомогената мозговой ткани, характеризующая общий уровень радиоактивности, не изменялась при гипервитаминозе, что согласуется с данными, ранее полученными в нашей лаборатории [9]. Не исключено, что при высокой концентрации витамина А снижается включение $2[^{14}\text{C}]$ ацетата в непосредственные предшественники биосинтеза гликофинголипидов. Так, по нашим предварительным данным, в этих условиях снижается УР свободных жирных кислот в микросомной фракции нервной ткани. Последнее может быть одной из причин снижения включения радиоактивного предшественника в керамидную часть молекул гликолипидов. Кроме того, обнаруженное нами увеличение содержания гликолипидов также может до некоторой степени объяснить снижение величины УР фракций гликолипидов за счет разбавления радиоактивной метки.

Данные литературы относительно действия избытка витамина А в диете на процесс миелинизации и, в связи с этим, на метаболизм липидов миелина немногочисленны и противоречивы. Имеются сведения о снижении их количества, особенно, свободного холестерина и фосфатидилэтаноламина в мозгу растущих крыс с гипervитаминозом А, а также обнаружено снижение включения [^{35}S] сульфата в СЦ мозга [20]. Кроме того, показано, что избыток витамина А вызывает снижение содержания холестерина в больших полушариях мозга молодых крыс и возрастание количества эфиров холестерина, что сопровождается резким падением УР эфиров холестерина [8]. Из этого следует, что, если вопрос о влиянии избытка витамина А в организме на метаболизм СЦ мозга обсуждается, то метаболизм Ц, являющихся непосредственными предшественниками в биосинтезе СЦ, не выяснен.

Механизм действия витамина А и его производных всесторонне исследуется на молекулярном уровне. Доказано его участие в процессе гликозилирования гликоконъюгатов и гликопротеинов, являющихся обязательными компонентами биологических мембран. При этом в качестве акцептора углеводных остатков выступает ретирил фосфат, что показано на микросомных системах печени, некоторых энзимальных и эпителиальных клетках, причем отмечается участие ретинолсвязывающего белка [21, 22]. Данные о существовании подобного механизма в НС отсутствуют. Тем не менее, на основании полученных нами результатов о значительном увеличении содержания гликолипидов в больших полушариях головного мозга можно предположить возможность вовлечения витамина А в транспорт галактозы с образованием UDP-галактозы, при конденсации которой с церамидом осуществляется биосинтез Ц и СЦ. В настоящее время трудно объяснить, каким образом витамин А оказывает влияние на сложный, многоступенчатый процесс миелинизации. Безусловно, требуются дальнейшие детальные исследования для выяснения этапа биосинтеза Ц и СЦ, наиболее чувствительного к уровню витамина А в организме.

THE EFFECT OF HYPERVITAMINOSIS A ON THE METABOLISM OF BRAIN CEREBROSIDES AND SULFOCEREBROSIDES

CHAEVA L. S., FOMICHOVA Y. V., OPARINA T. I.

A. A. Ukhtomskiy Institute of Physiology, State University, Leningrad

Cerebroside and sulfocerebroside contents were determined in various areas of 3 weeks-old rat brain (cerebral hemispheres, cerebellum, medulla oblongata) under hypervitaminosis A conditions. The data showed a stable correlation between cerebroside and sulfocerebroside fractions, although the content of glycolipids in hemispheres increased under the mentioned conditions. $2 [^{14}\text{C}]$ -acetate was used for the investigation of glycolipid metabolism. The specific radioactivity of studied glycolipids was significantly higher in cerebral hemispheres and cerebellum

than in medulla oblongata. These results indicate the different level of myelination of the various areas of 3 weeks-old rat brain.

Hypervitaminosis A produces a drop in the labelling of cerebrostides and sulfocerebrostides of brain areas being under investigation that may be considered as one of the proofs of the disturbance in the myelination process.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жаботинский Ю. М., Иоффе В. И. — В кн.: Экспериментальные аллергические демиелинизирующие заболевания нервной системы, Л., Медицина, 1973.
2. Таранова Н. П. — В кн.: Липиды центральной нервной системы при повреждающих воздействиях, Л., Наука, 1988.
3. Чаева Л. С. Вopr. мед. химии, вып. 6, с. 51—54, 1983.
4. Harish C., Joshi N., Srivastava A. Int. J. Vit. Nutr. Res., v. 52, p. 393—397, 1982.
5. Joshi H. C., Shukla R. R., Srivastava N. Int. J. Vit. Res., v. 53, p. 19—22, 1983.
6. Kean E. L. J. Lipid Res., v. 11, p. 252—256, 1970.
7. Goodman D. S. J. Nat. Cancer Inst., v. 73, p. 1375—1379, 1981.
8. Joshi H. G., Misra U. K. Int. J. Vit. Nutr. Res., v. 51, p. 93—95, 1981.
9. Опарина Т. И., Путилина Ф. Е. Вестник ЛГУ, вып. 4, с. 113—116, 1986.
10. Dugan R. E., Frigiero N. A., Seibert J. M. Anal. Chem., v. 36, p. 111—117, 1964.
11. Folch J., Lees M., Sloane-Stanley G. H. J. Biol. Chem., v. 226, p. 497—509, 1957.
12. Svennerholm L. J. Neurochem., v. 1, p. 42—53, 1956.
13. Чаева Л. С. — В кн.: Нервная система, вып. 13, Л., 1973.
14. Smith M. E. Adv. Lipid Res., v. 5, p. 241—278, 1967.
15. Чаева Л. С. — В кн.: Методы биохимических исследований (под ред. М. И. Прохоровой), ЛГУ, 1982.
16. Olson J. A. Biochem. Soc. Trans., v. 14, p. 928—930, 1986.
17. Vrbaski S., Kastic D. J. Neurochem., v. 27, p. 983—984, 1976.
18. Чаева Л. С. — Механизмы нервной интеграции, Тезисы Всесоюз. научной конференции, с. 48—50, Л., 1984.
19. Carter T. P., Kanfer J. V. J. Neurochem., v. 27, p. 53—62, 1976.
20. Clausen J. Eur. J. Biochem., v. 7, p. 575—582, 1969.
21. De Luca L. M., Bhat P. V., Sasak W., Adamo S. Federat. Amer. Soc. Exp. Biol., v. 38, p. 2535—2539, 1979.
22. Weber F. Proc. Nat. Soc., v. 42, p. 31—41, 1983.

Поступила 23. XII. 1990

УДК 577.352:616—006.487

ТРАНСПОРТ КАТИОНОВ И ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В КЛЕТКЕ НЕЙРОБЛАСТОМЫ С 1300 С РАЗЛИЧНЫМ СОДЕРЖАНИЕМ ХОЛЕСТЕРИНА В ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ

ВОЛКОВ Г. Л.

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

В исследованиях на клетках мышечной нейробластомы С1300 N18 с измененным липидным составом установлено, что базальный входящий поток одно- (Na^+ , R^+) и двухвалентных (Ca^{2+} , Mg^{2+}) катионов не зависит от концентрации холестерина в плазматической мембране.

Транспорт в клетку органических соединений (глицин, лизин, ацетат, глюкоза, тимидин) снижается, как и активность ряда мембраносвязанных ферментов (Na^+ , K^+ -АТФазы, щелочной фосфатазы, АХЭ) при отклонении содержания холестерина от уровня нормы в плазматической мембране клеток. Предполагается, что влияние холестерина на транспорт катионов компенсируется специальными механизмами липидного обмена в мембране, которые не затрагивают окружающего интегральный белок специфического липидного монослоя.

Важнейшей функцией биологических мембран является обеспечение избирательного полупроницаемого барьера, и, следовательно, организация уникального химического состава липидного бислоя. Изменения в содержании липидов мембраны могут привести к серьезным нарушениям ее функции путем снижения или повышения микровязкости липидного бислоя.

Являясь одним из основных липидных компонентов биологических мембран, холестерин признан и одним из главных модуляторов ее микровязкости [1]. Он изменяет пассивную проницаемость для ионов, глюкозы, неэлектролитов и воды [2—6], может стимулировать или ингибировать мембраносвязанные ферменты и рецептор-эффекторные системы [5, 7]. Однако в последние годы нами [8—9] и рядом других авторов [10—11] показано, что значительные изменения в содержании холестерина не вызывают нарушений микровязкости плазматической мембраны живой клетки. Кроме того, нами было установлено, что базальный выход одновалентного катиона из предварительно нагруженных клеток не изменялся при модуляции содержания холестерина [12].

Настоящее исследование предпринято с целью выяснения зависимости транспорта неорганических и органических соединений и активности мембраносвязанных ферментов от липидного состава плазматической мембраны живой клетки.

Жизнеспособные клетки мышинной нейробластомы C1300 № 18 с измененным содержанием холестерина получали ранее описанными методами. Сравнительный анализ липидов также приведен в указанных работах [13—18].

Контрольные и опытные клетки после отмывки липосом заливали 5 мл среды Игла, содержащей радиоактивные неорганические катионы или органические соединения в концентрации менее 5 нмоль. Через определенные интервалы времени (указаны на рисунках) среду сливали, клетки трижды промывали 5 мл среды, затем разрушали 1 н. раствором NaOH и аликвоты вносили в счетные флаконы, содержащие 10 мл ЖС-8; другие аликвоты использовали для определения содержания белка по Lowry и соавт. [19] для пересчета на количество клеток [13—18]. В исследованиях использовали $^{86}\text{Rb}^+$, $^{22}\text{Na}^+$, $^{45}\text{Ca}^{2+}$, $^{54}\text{Mg}^{2+}$, 2[^{14}C] ацетат Na, 2[^{14}C] глицин, D, L-1-[^{14}C] ализин, 2[^{14}C] глюкозу, тимидин-5-метил [$^3\text{H}_2$] (все отечественного производства).

Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «1214 Rackbeta Flexival LSC» («Pharmacia», Швеция) с учетом гашения и выражали в расч./мин 10^6 клеток.

Плазматические мембраны клеток выделяли разработанным нами методом [20]. Активность ферментов измеряли, как описано ранее [20].

Результаты и обсуждение

При использовании метода, направленного на изменение содержания холестерина в клетках нейробластомы C1300 № 18 с помощью фосфатидилхолиновых и фосфатидилхолестеринных липосом, через 30 мин инкубации (концентрация липосом по фосфатидилхолину 5,0 мкмоль/1 мл взвеси) наблюдается заметное изменение концентрации стерина при высокой жизнеспособности клеток [13—18, 21]. Таким образом, в приводимых экспериментах по изучению транспорта катионов и органических соединений использовали жизнеспособные клетки с повышенным ($26,43 \pm 0,66$ нмоль на 10^6 клеток или 381 ± 20 нмоль на мг белка мембраны) или пониженным ($13,82 \pm 0,49$; 71 ± 4) содержанием холестерина по сравнению с контрольными клетками ($17,55 \pm 0,84$; 271 ± 9).

Результаты исследования базального потока внутрь клеток одного и двухвалентных катионов представлены на рис. 1. Как следует из приведенных данных, значительное изменение содержания холестерина в плазматической мембране клеток (повышение на 70 и снижение на 74%) совершенно не оказывает влияния на базальный входной поток исследованных катионов.

Данные по изучению транспорта органических соединений в клетку нейробластомы представлены в рис. 2. Обращает на себя внимание тот факт, что и повышение концентрации холестерина, и ее снижение существенно тормозят вход в клетку всех исследованных органических

соединений. Так, избыток холестерина в мембране на 70% снижает накопление в клетке ацетата на 28%, глицина—на 45%, лизина—на 34%, тимидина—на 36% и глюкозы—на 45%. В то же время недостаток холестерина на 74% снижает указанные показатели на 26, 30, 20, 12 и 25% соответственно.

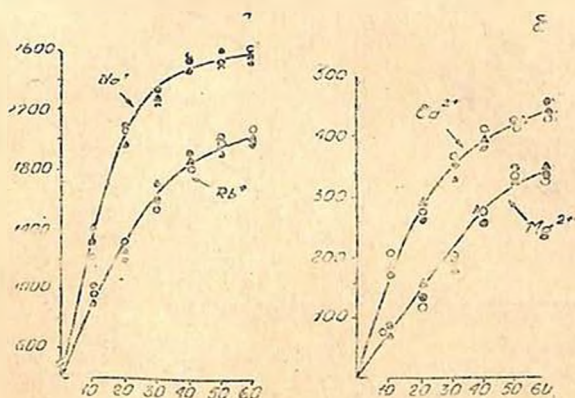


Рис. 1. Накопление одновалентных (а) и двухвалентных (б) катионов в клетках нейробластомы С1300 № 18 с различным содержанием холестерина в плазматической мембране (во всех случаях различия не достоверны): ○—○—○—контрольные клетки, ◐—◐—◐—клетки с пониженным содержанием холестерина, ▲—▲—▲—клетки с повышенным содержанием холестерина. По оси абсцисс—время инкубации с изотопом (мин), по оси ординат—расп. мин⁻¹ · 10⁻⁶ клеток

Изучение активности мембраносвязанных ферментов в плазматической мембране клеток (рис. 3) показало, что в обоих случаях при пониженной и повышенной концентрации холестерина активность ферментов ингибируется в той или иной степени. Причем незначительное снижение содержания холестерина (через 15 мин инкубации, на 30—40%), как и ожидалось [6], приводит к временному повышению активности Na^+ , K^+ -АТФазы.

Важно подчеркнуть, что как в случае для транспорта органических соединений [10—11, 22], так и активности ферментов [10—11, 23], наши данные практически полностью совпадают с данными литературы.

Отмеченное нами противоречие, заключающееся в ингибировании активности мембраносвязанных ферментов и транспорта органических соединений, связанных с изменением концентрации холестерина в плазматической мембране и отсутствием влияния этого фактора на базальный вход катионов находит свое объяснение в современных концепциях липид-белкового взаимодействия.

В настоящее время нет сомнений в том, что часть липидов в мембране прочно связана с интегральными белками [10], в том числе и ферментативными [10]. Ряд физико-химических исследований с применением методов спин-электронного резонанса и $[^2\text{H}]$ ЯМР достаточ-

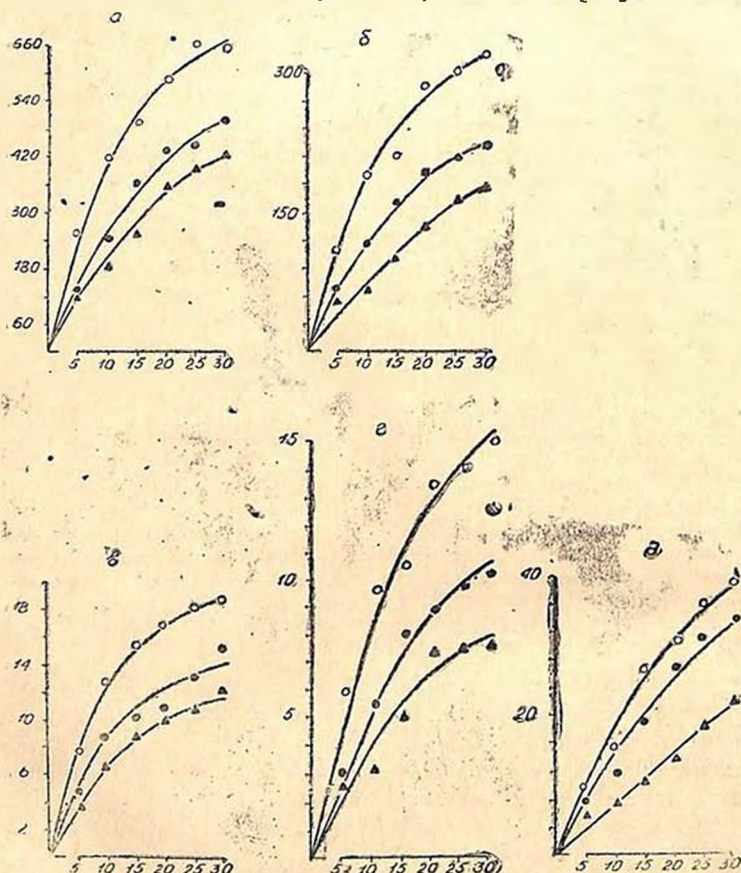


Рис. 2. Накопление $2[^{14}\text{C}]$ ацетата (а), $2[^{14}\text{C}]$ глицина (б), D,L-1- $[^{14}\text{C}]$ липидов (в), $2[^{14}\text{C}]$ глюкозы (г) и тимидина-5-метил $[^3\text{H}]$ в клетках нейробластомы С1300 № 18 с различным содержанием холестерина в плазматической мембране: ○—○—○—контрольные клетки, ◐—◐—◐—клетки с пониженным содержанием холестерина, ▲—▲—▲—клетки с повышенным содержанием холестерина. По оси абсцисс—время инкубации с изотопом (мин), по оси ординат—радиоактивность клеток, расп. мин $^{-1}$ 10^{-3} клеток

но убедительно показал, что липиды формируют вокруг интегрального белка как минимум прочносвязанный монослой (так называемый «липидный аннулюс»). Причем скорость обмена липидов аннулюса белка составляет примерно 1 сек^{-1} [10]. Таким образом, липидный

бислой мембраны в упрощенном варианте можно рассматривать как собственно классический липидный бислой и встроены в него липидный аннулюс, который в свою очередь заключает в себе интегральный белок. По-видимому, регуляция микровязкости [8—9] осуществ-

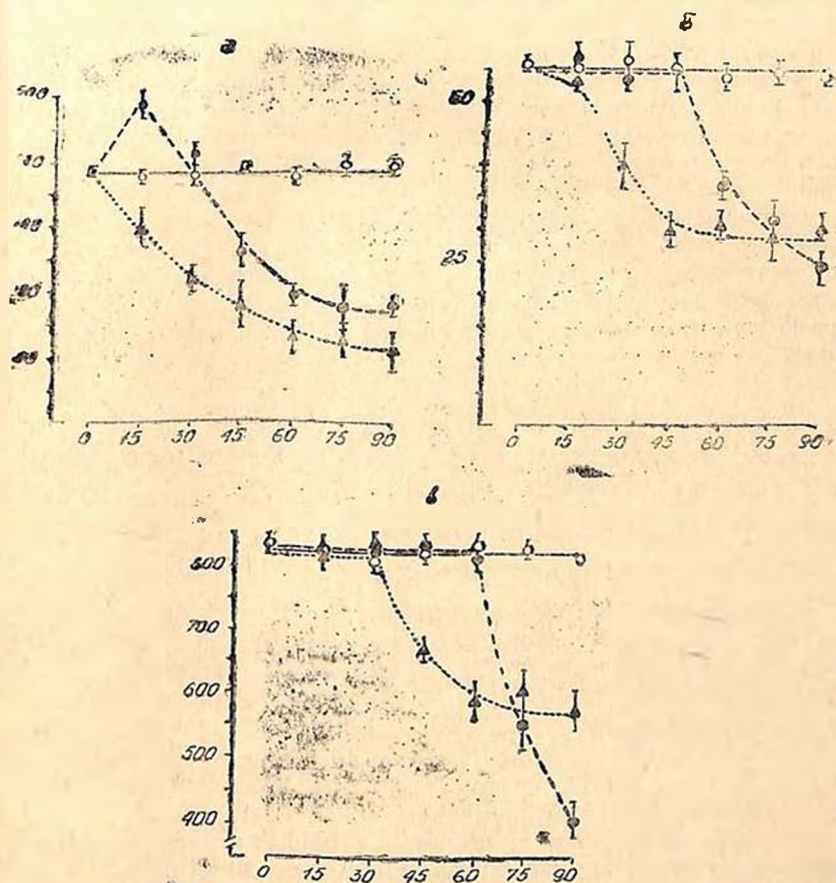


Рис. 3. Зависимость активности Na^+, K^+ -АТФазы (а), щелочной фосфатазы (б) и ацетилхолинэстеразы (в) плазматической мембраны клеток нейробластомы С1300 № 18 от содержания холестерина: $\circ-\circ-\circ$ — контрольные мембраны, $\bullet-\bullet-\bullet$ — мембраны с пониженным содержанием холестерина, $\Delta-\Delta-\Delta$ — мембраны с повышенным содержанием холестерина. По оси абсцисс — время инкубации с липосомами (мин), по оси ординат — активность фермента (нмоль отщепленного $P_1 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$ белка)

вляется только в классическом бислое и не затрагивает липидный аннулюс. В то же время нами было показано, что при повышенных или пониженных концентрациях холестерина в клетке наблюдаются

значительные изменения в липидах, прочно связанных с белками [24]. Необходимо также отметить, что базальный вход катионов осуществляется без участия какого-либо переносчика, тогда как это необходимо для транспорта органических соединений.

Следовательно, как в случае классического бислоя, так и липидного аннулюса белка, при изменении концентрации холестерина в плазматической мембране происходят соответствующие изменения состава липидов. Но в бислое они могут быть компенсированы специальными механизмами [8—9], которые отсутствуют в аннулюсе, поэтому может наблюдаться отмеченное нами выше кажущееся противоречие.

Очевидно, что изменения липидного окружения широкой области мембраны, интегрирующей фермент или белок с другими функциями, может оказывать определенное влияние на активность последнего, как это отмечено для Na^+ , K^+ -АТФазы. Однако, с нашей точки зрения, только изменения липидного слоя аннулюса белка вызывают стойкие нарушения его функции.

CATION AND ORGANIC COMPOUNDS TRANSPORT INTO NEUROBLASTOMA C 1300 CELLS WITH ALTERED CHOLESTEROL CONTENT IN PLASMA MEMBRANE

VOLKOV G. L.

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

Using mouse neuroblastoma C 1300 N18 cells with modified lipid composition we proved that the basal entrancing stream of monovalent (Na^+ , Rb^+) and bivalent (Ca^{2+} , Mg^{2+}) cations did not depend on plasma membrane cholesterol concentration. When plasma membrane cholesterol content was altered from normal level, the transport of organic compounds (acetate, glycine, lysine, glucose, thymidine) was decreased as well, as the membrane-bound enzymes activity (Na^+ , K^+ -ATPase, alkaline phosphatase, acetylcholinesterase).

Special compensating mechanisms of lipid exchange in plasma membrane are acting against condensing cholesterol effect on lipid bilayer, and as a result cation transport is not disturbed. The lipid annulus of integral protein has not such mechanisms and alterations of annulus lipid normal content are becoming inevitable. This leads to destruction of membrane-bound proteins stable function.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nemecz G., Fantaine R. N., Schroeder F. *Biochim. et biophys. acta*, v. 943, № 3, p. 511—521, 1988.
2. Demel R. A., Bruckdorfer K. R., Van Deenen L. L. M. *Biochim. et biophys. acta*, v. 255, № 1, p. 321—330, 1972.
3. Finkelstein A., Cass A. *Nature*, v. 216, № 18, p. 717—718, 1967.

4. Yeagle P. L., Martin R. B., La'a A. K. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 74, № 11, p. 4924—4926, 1977.
5. Papahadjopoulos D., Nir S., Ohki S. *Biochim. et biophys. acta*, v. 266, № 3, p. 561—563, 1972.
6. Yeagle P. L. *Biochim. et biophys. acta*, v. 822, № 1, p. 267—287, 1985.
7. Гулая Н. М., Бездробный Ю. В., Гаврилюк Е. С. *Укр. биохим. журн.*, т. 60, № 3, с 3—10, 1988.
8. Волков Г. Л., Худякова Н. А., Говсеева Н. Н., Гулая Н. М. *Докл. АН УССР*, сер. Б, № 4, с. 31—37, 1990.
9. Волков Г. Л. *Нейрохимия*, т. 9, № 1, с. 55—63, 1990.
10. Yeagle P. L. *FASEB J.* v. 3, № 7, p. 1833—1842, 1989.
11. Hazel J. R.—In: *Physiological Regulation of Membrane Fluidity*, p. 149—158 Alan R. Liss, Inc., 1988.
12. Гулая Н. М., Волков Г. Л., Лишко В. К. *Укр. биохим. журн.*, т. 58, № 1, с. 44—48, 1986.
13. Волков Г. Л., Гулая Н. М., Говсеева Н. Н., Артеменко Н. П. *Цитология*, т. 26, № 9, с. 1064, 1984.
14. Гулая Н. М., Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Артеменко Н. П. *Укр. биохим. журн.*, т. 58, № 1, с. 39—43, 1986.
15. Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Гулая Н. М., Артеменко Н. П. *Укр. биохим. журн.*, т. 3, № 2, с. 185—190, 1986.
16. Гулая Н. М., Волков Г. Л., Говсеева Н. Н., Артеменко Н. П. *Укр. биохим. журн.*, т. 59, № 4, с. 64—69, 1987.
17. Волков Г. Л. *Укр. биохим. журн.*, т. 61, № 6, с. 76—80, 1989.
18. Волков Г. Л., Гулая Н. М., Говсеева Н. М. *Укр. биохим. журн.*, т. 61, № 6, с. 79—75, 1989.
19. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall J. R. *J. Biol. Chem.*, v. 193, № 2, p. 265—275, 1951.
20. Волков Г. Л. *Укр. биохим. журн.*, т. 61, № 5, с. 71—76, 1989.
21. Gulaya N. M., Volkov G. L., Klimashevsky V. M. *Neuroscience*, v. 34, № 3, p. 785—792, 1990.
22. Madden T. D., Chapman D., Quinn P. J. *Nature*, v. 279, № 4, p. 538—540, 1979.
23. Craigo M., Etbl H., Barrantes F. J. *Biochemistry*, v. 21, № 12, p. 3622—3627 1982.
24. Климашевский В. М., Волков Г. Л., Гаврилюк Е. С. и др. *Докл. АН УССР*, Сер. Б, № 9, с. 60—63, 1989.

Поступила 19. VII 1990

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.175.62:612.822.1:57.034

ВЛИЯНИЕ АНДРОГЕНОВ НА ЦИРКАДНЫЙ РИТМ C_1 СЕРОТОНИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ МОЗГА

МАСЛОВА Г. Б., ШИШКИНА Г. Т.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Серотонин головного мозга участвует в регуляции функций половых желез и полового поведения [1—3]. Регулирующее влияние серотониновой системы мозга осуществляется через специфические серотониновые рецепторы, поэтому изучение контроля количества и сродства этих рецепторов к медиатору представляется чрезвычайно важным. Имеющиеся литературные сведения позволяют предполагать участие в этом контроле половых гормонов. Показано, что эстрогены могут изменять рецепторное связывание серотонина в головном мозгу самок крыс [4—6]. Относительно андрогенов таких данных нет, однако известно, что тестостерон способен изменять активность центральной серотонинергической системы, что проявляется, например, в изменении содержания серотонина мозга после кастрации. Хорошо известно, что в течение суток уровень тестостерона в крови меняется. В наших исследованиях было обнаружено влияние суточных ритмов на рецепторное связывание [3H]серотонина во фронтальной коре и гиппокампе крыс (в гипоталамусе суточных изменений C_1 рецепторов не выявлено) [7]. Поэтому целью данной работы было сравнительное исследование суточных ритмов C_1 рецепторов мозга и уровня тестостерона в крови у крыс.

В опытах были использованы половозрелые самцы крыс линии *Wistar* массой 200—210 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария при естественном освещении; корм и воду получали без ограничений. Четыре группы животных (по 7—9 крыс) декапитировали в 9, 15, 21 и 3 ч. Определение концентрации тестостерона проводили в смешанной периферической крови радиониммунным методом с помощью стандартных наборов Стерон-Т-[3H] (Минск).

Группы интактных и кастрированных за две недели до опыта самцов крыс декапитировали в одно и то же время суток, быстро на льду выделяли фронтальную кору и гиппокамп, которые хранили в жидком азоте до анализа рецепторного связывания. Рецепторное связывание [3H]серотонина (18 Ки/ммоль и 10,5 Ки/ммоль; «Amersham»,

Англия) мембранами исследуемых отделов мозга определяли радиолигандным методом [8] с некоторыми модификациями [9]. В качестве немеченого вытеснителя использовали буфотенин («Serva», ФРГ) в концентрации 10 мкМ. Связывание определяли при фиксированной концентрации метки (20 пМ). В качестве инкубационной среды использовали 0,05 М трис-НСl буфер (pH 7,56), содержащий аскорбиновую кислоту (0,1%), CaCl_2 (0,002 М) и паргиллин (10^{-5} М). Количество белка в пробе определяли по методу Lowry и соавт. [10]. Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Суточные изменения рецепторного связывания меченого серотонина были обнаружены в двух отделах мозга самцов крыс: фронтальной коре и гиппокампе. Повышение связывания наблюдали в темное время суток (максимальные значения в коре были отмечены в 21 и 3 ч, а в гиппокампе—в 3 ч; рис. 1). Ранее было показано, что суточные изменения серотонинного рецепторного связывания никак не коррелировали с колебаниями концентрации серотонина и его метаболита в этих отделах мозга [7].

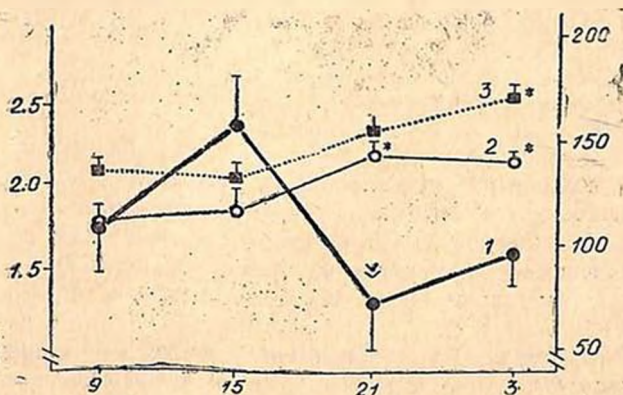


Рис. 1. Суточные изменения концентрации тестостерона в плазме крови и C_1 рецепторного связывания в мозгу крыс. 1—тестостерон, 2— C_1 рецепторы во фронтальной коре, 3— C_1 рецепторы в гиппокампе. * $p < 0,05$ по сравнению со значением в 9 ч. По оси абсцисс—время суток, ч, по оси ординат: слева—концентрация тестостерона (нг/мл), справа—специфическое связывание $[^3\text{H}]$ серотонина (фмоль/мг белка)

В то же время суток у крыс было измерено общее содержание тестостерона в плазме крови. Оказалось, что наивысшие значения уровня гормона наблюдались в 15 ч, а самые низкие—в 21 ч (рис. 1). Это хорошо согласуется с имеющимися в литературе немногочисленными данными об изменении концентрации тестостерона в течение суток у крыс другой линии (Sprague-Dowley) [11].

При сопоставлении суточных колебаний серотониновых рецепторов мозга и уровня гормона в плазме крови обнаруживается, что изменения уровня S_1 рецепторного связывания во фронтальной коре мозга противоположны изменению уровня тестостерона (рис. 1). То есть, при минимальной концентрации тестостерона наблюдается максимальное возрастание S_1 рецепторного связывания. Этот факт может быть не случайным, если предположить, что мужские половые гормоны, так же, как и женские, способны изменять плотность серотониновых рецепторов в мозгу крыс. Известно, что у самок крыс плотность S_1 рецепторов в переднем мозгу меняется на протяжении эстрального цикла, а введение эстрогенов вызывает двухфазное изменение плотности S_1 рецепторов в некоторых структурах мозга [4, 6].

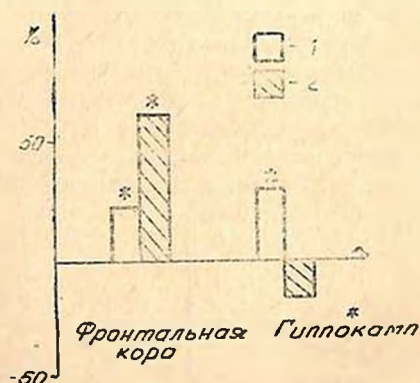


Рис. 2. Влияние кастрации на суточные изменения S_1 рецепторного связывания в гиппокампе и фронтальной коре мозга. 9-часовые значения рецепторного связывания приняты за 0. По оси ординат — рецепторное связывание [3H]серотонина. 1 — интактные животные, 2 — кастрированные животные. * $p < 0.05$ по сравнению с 9-часовым значением

Чтобы подтвердить существование возможного влияния уровня мужских половых гормонов на величину рецепторного связывания серотонина, мы измерили S_1 рецепторное связывание во фронтальной коре и гиппокампе кастрированных самцов крыс в то время суток, когда у интактных животных наблюдались наиболее значительные изменения.

Оказалось, что во фронтальной коре это различие возросло; значение S_1 рецепторного связывания в 3 ч почти в два раза превышало эти значения в 9 и 15 ч (рис. 2). Судя по этим данным, андрогены ослабляют S_1 рецепторное связывание во фронтальной коре мозга, поэтому при снижении их концентрации в крови в темное время суток наблюдается возрастание рецепторного связывания серотонина. Исчезновение гормонов, вызванное кастрацией, приводит к еще более значительному повышению S_1 рецепторного связывания.

Однако в гиппокампе, несмотря на противоположно направленные изменения S_1 рецепторного связывания и уровня тестостерона у интактных крыс в темное время суток, удаление семенников привело к совершенно иному результату: у кастрированных животных достоверно снижалось рецепторное связывание в 3 ч по сравнению с 9 ч (рис. 2). Эти данные не позволяют сделать однозначного заключения

о влиянии уровня тестостерона крови на величину C_1 рецепторного связывания в гиппокампе. Можно только предположить, что в этом отделе мозга влияние тестостерона на серотониновые рецепторы реализуется через иные механизмы, чем в коре. Кроме того, серотониновые рецепторы гиппокампа, очевидно, регулируются и иными факторами, в том числе, возможно, другими гормонами, изменение которых после двухсторонней кастрации приводит к значительному снижению C_1 рецепторного связывания в гиппокампе.

Таким образом, C_1 рецепторы фронтальной коры и гиппокампа по-разному реагируют на изменение гормонального баланса при кастрации. Различная реакция серотониновых рецепторов коры и гиппокампа на относительно быстрые изменения уровня тестостерона, вызванные односторонней кастрацией, была обнаружена и ранее [12]. По-видимому, нельзя исключить возможности, что эти различия связаны с неодинаковым соотношением в структурах мозга подтипов C_1 рецепторов, имеющих разное функциональное значение и регуляцию. Так, показано, что во фронтальной коре C_{1A} рецепторов в 10 раз меньше, чем в гиппокампе, а C_{1AV} рецепторов в два раза больше [13].

Следует отметить, что к связыванию [3H] серотонина со специфическими рецепторами, локализованными на мембране, не имеют отношения серотонинсвязывающие белки, которые обнаружены в цитозоле [14].

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что андрогены могут влиять на суточные изменения рецепторного связывания [3H] серотонина в мозгу крыс, однако характер их влияния различен во фронтальной коре и гиппокампе.

EFFECTS OF ANDROGENS ON CIRCADIAN VARIATIONS OF 5-HT₁ RECEPTORS IN THE RAT BRAIN

MASLOVA G. B., SHISHKINA G. T.

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

Circadian variations of serotonin-1 receptor binding in the hippocampus and frontal cortex of intact and castrated male rats were studied using [3H] serotonin as a ligand. Circadian dynamics of the plasma testosterone level was studied as well. The maximal and minimal testosterone concentrations in blood were observed at 15 and 21 h respectively. The highest values of serotonin-1 receptor binding were found at the dark period both in the frontal cortex and hippocampus (as 21 and 3 h). The effect of castration were different in the brain regions: the increase of serotonin-1 receptor binding at the dark period became more marked in the frontal cortex and was replaced by significant decrease in the hippocampus. It was supposed that the androgens can affect serotonin-1 receptor binding in the brain, in particular alter its circadian rhythms.

ЛИТЕРАТУРА

1. Науменко Е. В., Осадчук А. В., Серова Л. И., Шишкина Г. Т. Генетико-физиологические механизмы регуляции эндокринной функции семенников. Новосибирск, Наука, 1983.
2. Попова Н. К., Науменко Е. В., Колпаков В. Г. Серотонин и поведение, Новосибирск, 1978.
3. Sodersten P., Larsson K., Ahlenius S., Engel J. Pharmacol. Biochem. Behav., v. 5, p. 319—327, 1976.
4. Bigon A., McEwen B. S. J. Neurosci., v. 2, p. 199, 1982.
5. Bigon A., Riches A., Snyder L., McEwen B. S. Life Sci., v. 32, p. 2015—2022, 1983.
6. Uphouse L., Williams J., Eckols K., Sierra V. Brain Res., v. 381, p. 376—381, 1986.
7. Маслова Г. Б., Августинович Д. Ф. Нейрохимия, т. 8, № 4, с. 537—540, 1989.
8. Peroutka S. J., Snyder S. H. Mol. Pharmacol., v. 16, p. 687—699, 1978.
9. Пак Д. Ф., Маслова Г. Б., Куликов А. В., Борлятов В. В. Вopr. мед. химии, № 4, с. 17—21, 1988.
10. Lowry O. I., Rosibrough N. J., Farr A. L., Randall R. Y. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
11. Ka'ra P. S., Ka'ra S. P. Endocrinology, v. 101, p. 1821—1827, 1977.
12. Маслова Г. Б., Августинович Д. Ф., Попова Н. К. Тезисы докл. V Всесоюз. конф. «Физиология и биохимия медиаторных процессов», М., с. 184, 1990.
13. Корнеев А. Я. Нейрохимия, т. 9, № 1, с. 125—140, 1990.
14. Lui K. P., Taitz H., Nisling S., Andersberg A., Pershan M. D. Dev Brain Res., v. 32, p. 31—41, 1987.

Поступила 20. I 1991

УДК 612.822.1+612.815.1

РЕЦЕПТОРНОЕ СВЯЗЫВАНИЕ ГЛУТАМАТА В СТРИАТУМЕ ОБУЧЕННЫХ И НЕОБУЧЕННЫХ КРЫС

КАРПОВА И. В., *ГОРОДИНСКИЙ А. И.

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

*Институт мозга человека АН СССР, Ленинград

Глутаминовая кислота, являясь одним из важнейших возбуждающих медиаторов головного мозга млекопитающих, принимает участие во многих процессах, происходящих в ЦНС. В частности, широко обсуждается гипотеза о функции глутамата и глутаматных рецепторов в механизмах обучения и памяти [1, 2]. Важную роль в этих процессах играют базальные ганглии, в том числе и стриатум [3]. Показано, что основным медиатором кортико-стриатных проекций является глутамат [4]. Имеются данные, что блокада глутаматных рецепторов стриатума способна нарушать выполнение некоторых условнорефлекторных задач [5]. Можно предположить, что при образовании и сохранении условных рефлексов изменяется функциональное состояние глутаматергической системы стриатума.

Целью настоящей работы явилось изучение возможных изменений рецепторного связывания [^3H]L-глутамата с мембранными препаратами, выделенными из стриатума крыс, в процессе обучения.

Опыты проводили на 38 самцах крыс линии *Sprague-Dawley* массой 200—400 г, у 19 из которых вырабатывали инструментальный пищевой рефлекс в камере Скиннера. Синаптические мембраны (СМ) выделяли из стриатума крыс, как это было описано ранее [6]. Глубокую фракцию постсинаптических уплотнений (ПСУ) выделяли модифицированным методом [7]. Специфическое связывание [^3H]L-глутамата с СМ и ПСУ определяли радиолигандным методом [6], используя стекловолокнистые фильтры «Whatman» GF/F (Англия) и прибор для точечного блоттинга («Minifold», Schleicher, Schuell).

Анализ кривых насыщения участков связывания [^3H]L-глутамата на СМ и ПСУ методом Скэтчарда позволил выявить различия между группами обученных и необученных животных. У обученных животных связывание [^3H]L-глутамата с ПСУ было выше, чем у необученных. Увеличение рецепторного связывания [^3H]L-глутамата с ПСУ у обученных животных происходило в основном за счет возрастания числа участков связывания (рисунк): величины B_{max} для

групп обученных и необученных крыс составляли соответственно 12,86 и 5,71 пмоль/мг белка. В экспериментах на фракции СМ различия между двумя группами животных не проявлялись.

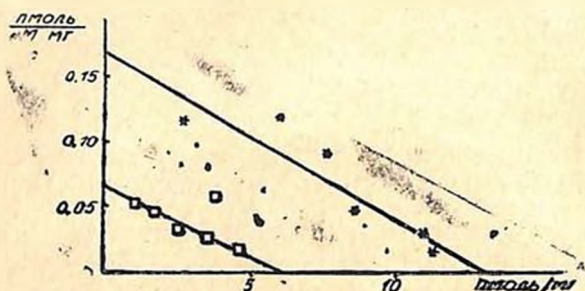


Рис. Связывание $[^3\text{H}]$ Л-глутамата с фракцией постсинаптических уплотнений из стриатума обученных (*) и необученных (□) крыс (данные представлены в координатах Скэтчарда)

Эффект увеличения специфического связывания $[^3\text{H}]$ Л-глутамата ПСУ, выделенными из стриатума крыс, сохранялся спустя два месяца после окончания обучения, но лишь у животных, сохранивших условный рефлекс. У крыс, утративших приобретенный навык, уровень связывания $[^3\text{H}]$ Л-глутамата ПСУ не отличался от контроля.

Результаты данной работы свидетельствуют о том, что при обучении происходит изменение рецепции глутамата в стриатуме, которое выражается в увеличении количества участков связывания этого медиатора фракцией ПСУ. Так как известно, что основным глутаматергическим входом стриатума являются кортико-стриатные связи [4], можно предположить, что при обучении имеет место усиление кортико-стриатных взаимодействий. Тот факт, что подобные изменения наблюдаются у крыс, сохранивших условный рефлекс после двухмесячного перерыва, и отсутствуют у животных, утративших навык, позволяет говорить о том, что возрастание числа рецепторов глутамата может сопровождать процессы формирования и хранения долговременной памяти.

GLUTAMATE RECEPTOR BINDING IN THE STRIATUM OF THE TRAINED AND UNTRAINED RATS

KARPOVA I. V., GORODINSKY A. I.

I. P. Pavlov Institute of Physiology
Institute of Human Brain, Academy of Sciences of USSR, Leningrad

$[^3\text{H}]$ L-glutamate specific binding to synaptic membranes and post-synaptic densities (PSD), isolated from the striatum of normal untrained rats and that were trained in the Skinner's box, was investigated. The

feeding conditioned reflex development was shown to be accompanied with the increase of [^3H]L-glutamate specific binding to PSD but not to synaptic membranes. The effect obtained was associated with the binding sites density (B_{max}) enhancement.

ЛИТЕРАТУРА

1. Городинский А. И., Дамбинова С. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 70, с. 285—288, 1986.
2. Дамбинова С. А. Нейрорецепторы глутамата, Л., Наука, 1989.
3. Суворов Н. Ф. Стриарная система и поведение, Л., Наука, 1980.
4. Luini A., Goldberg O., Teichberg V. I. Neurosci. Let., v. 41, p. 307—312, 1983.
5. Hauber W., Schmidt W. J. J. Neural Transmiss., v. 78, p. 29—41, 1989.
6. Дамбинова С. А., Городинский А. И. Биохимия, т. 49, с. 67—75, 1984.
7. Cohen R. S., Blomberg F., Berzins K., Siekevits P. J. Cell. Biol., v. 74, p. 181—203, 1977.

Поступила 3. I 1991.

УДК 577.112.389.6+612.82

ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДНЫХ ФРАГМЕНТОВ ОСНОВНОГО БЕЛКА МИЕЛИНА НА СВЯЗЫВАНИЕ [³H] ДИЛТИАЗЕМА С СИНАПТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ МОЗГА

ШАНШИАШВИЛИ Л. В., МИКЕЛАДЗЕ Д. Г.

Институт физиологии АН Грузии, Тбилиси

Основной белок миелина (ОБМ) является главным компонентом миелина ЦНС. Этот белок локализован с цитоплазматической стороны миелиновой мембраны и, как предполагают, играет ведущую роль в сборке и формировании миелиновой структуры [1]. Скорость обновления ОБМ довольно высока ($0,9 \cdot 10^{-12}$ моль/с) [2] и зависит от локализации белка в миелиновой оболочке, степени посттрансляционной модификации, а также функционального состояния миелинизированного аксона [3, 4]. ОБМ и его фрагменты являются иммунологически активными и содержат эпитопы, индуцирующие аутоиммунные реакции типа аллергического энцефаломиелита (АЭ) [5]. Они вызывают антигенную активацию рецепторов иммунных клеток [6] и, кроме того, могут взаимодействовать с некоторыми рецепторными системами и приводить к изменению функционального состояния нервных клеток [2, 7]. Учитывая, что активация иммунных клеток и метаболические процессы нейронов регулируются посредством Ca^{2+} -зависимых процессов, целью настоящего исследования являлось выяснение механизмов действия пептидных фрагментов ОБМ на кальциевые каналы плазматических мембран. В работе была изучена модуляция связывания блокатора Ca^{2+} -каналов [³H] дилтиазема пептидами, полученными после триптического гидролиза ОБМ.

Синаптические мембраны выделяли по методу De Robertis и соавт. [8]. Определение связывания [³H] дилтиазема проводили в среде, содержащей 35 мМ трис-НСl, рН 7,4 и 10 нМ [³H] дилтиазема (153 Кп/ммоль, «Amersham», Англия). Инкубирование проводили в течение 60 мин при 20° и смесь фильтровали на фильтре GF/C («Whatman», Англия). Для определения неспецифического связывания использовали 1 мкМ верапамил («Sigma», США). Радиоактивность на фильтрах считали в толуольной сцинтилляционной смеси.

Триптический гидролиз ОБМ проводили по методу Shoji и соавт. [9]. Фрагменты разделяли с помощью жидкостной хроматографии высокого давления (ЖХВД) на колонке Nova Pak C 18 («Millipore-Waters», США) при возрастающих концентрациях ацето-

нитрила. Элюаты (0,5 мл) собирали, лиофилизировали и использовали в опытах по связыванию [^3H]дилтиазема.

В опытах использовали ОБМ фирмы «Sigma» (США). Анализ этого белка электрофорезом в ПААГ показал наличие полос с величинами M_r 14 (20%) и 18,5 кД (80%). После инкубирования ОБМ с протеникиназой С, а также с Ca^{2+} -кальмодулинзависимой и сАМР-зависимой протеникиназами с последующим разделением фрагментов с помощью хроматографий высокого давления и определения аминокислотного состава было обнаружено, что в коммерческом препарате ОБМ около 30% фрагмент 93—135 является эндогенно фосфорилированным.

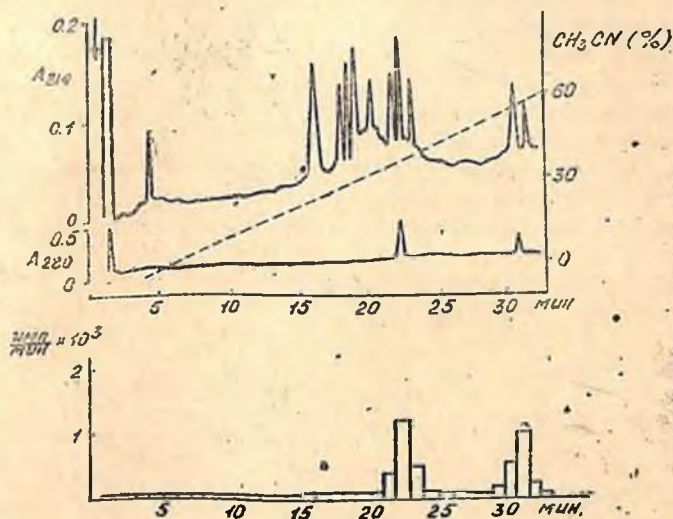


Рис. 1. Жидкостная хроматография высокого давления пептидов основного белка миелина на колонке Nova Pak C18; а—поглощение при 214 и 280 нм, б—специфическое замещение [^3H]дилтиазема с мембранами

Анализ фракций, полученных после хроматографического разделения триптического гидролизата ОБМ показал, что на связывание [^3H]дилтиазема с оннаптическими мембранами влияют две фракции пептидов, выходящие при концентрациях ацетонитрила, равных 44—45% и 55—56% и имеющих поглощение как при 214 нм, так и при 280 нм (рис. 1). Учитывая наличие единственного остатка триптофана в ОБМ, имеющего поглощение при 280 нм, следует заключить, что обе фракции соответствуют пептидному фрагменту 93—135, образующемуся при триптическом расщеплении ОБМ. По данным Shoji и соавт. [9], фрагмент 93—135, являющийся фосфорилированным по Ser-115 пептидом, элюируется с колонки при низких концентрациях ацетонитрила, в то время как более гидрофобная, нефосфорилированная форма пептида выходит в более позднем объеме.

Следует отметить, что действие фосфорилированного пептида на связывание [^3H] дилтиазема носит 2-фазный характер (рис. 2, а). Низкие концентрации этого пептида ингибируют связывание лиганда, тогда как при высоких концентрациях происходит увеличение связывания. В отличие от фосфорилированного, нефосфорилированный пептид вызывал лишь ингибирование связывания [^3H] дилтиазема с характерной кривой зависимости вытеснения лиганда от концентрации замещающего агента (рис. 2, б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что фрагмент ОБМ 93—135 вызывает снижение связывания [^3H] дилтиазема с белками кальциевого канала синаптических мембран, тогда как фосфорилированная форма этого фрагмента способна также, при определенных концентрациях, увеличивать связывание. Мы не можем в настоящее время сказать, являются ли эти изменения результатом непосредственного воздействия пептида на дилтиаземсвязывающие белки или они опосредованы механизмами, обусловленными какими-либо другими рецепторными системами нейротрансмиттеров, приводящими к количественному перераспределению кальциевых каналов в клетке. Тем не менее, полученные нами данные, а также ис-

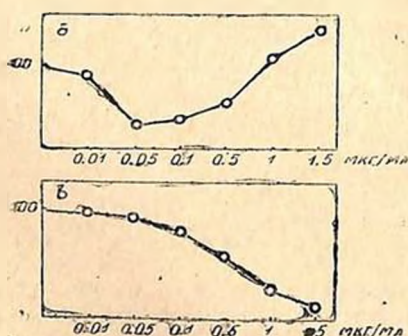


Рис. 2. Зависимость связывания [^3H] дилтиазема с синаптическими мембранами при разных концентрациях пептидов; а—I фрагмент основного белка миеллина, б—II фрагмент основного белка миеллина. По оси ординат—% специфического связывания [^3H] дилтиазема

следования Нye и соавт. [7] свидетельствуют о возможности регуляции определенных рецепторов нервной ткани пептидными фрагментами ОБМ.

Предварительный анализ полученных пептидов, как уже было показано выше, свидетельствует о том, что фрагменты, действующие на [^3H] дилтиаземсвязывающие белки, являются фосфорилированной и дефосфорилированной формами пептида 93—135 ОБМ, несущего основную антигенную детерминанту ОБМ и индуцирующего ЛЭ [5]. Поскольку предполагается, что фосфорилирование пептида по Ser-115 может иметь существенное значение в механизмах индукции ЛЭ [10], полученные нами данные относительно разнонаправленного действия модифицированных и немодифицированных форм пептидов могут свидетельствовать о ключевой роли процессов фосфорилирования ОБМ

в модуляции кальциевых каналов в нейронах и указывать на возможные адекватные механизмы изменения обмена кальция иммунных клеток.

THE ACTION OF PEPTIDE FRAGMENTS OF MYELIN BASIC PROTEIN ON $[^3\text{H}]$ DILTIAZEM BINDING WITH BRAIN SYNAPTIC MEMBRANES

SHANSHASHVILI L. V., MIKELADZE D. G.

Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi

The action of peptide fragments of myelin basic protein (MBP) on the binding of $[^3\text{H}]$ diltiazem with synaptic membranes was studied. It was shown that binding of $[^3\text{H}]$ diltiazem with membranes was changed only in the presence of two peptides obtained after tryptic hydrolysis of MBP and characterized by absorption at 280 nm. The first of them inhibited the binding of $[^3\text{H}]$ diltiazem with membranes in a concentration-dependent manner while the effect of the other one beared biphasic character. The binding of $[^3\text{H}]$ diltiazem is proposed to be altered under the influence of phosphorylated and nonphosphorylated forms of peptide 93—135 of MBP.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Smith R. *Biochim. et Biophys. acta.*, v. 470, p. 170—184, 1977.
2. Honneggen C. G., Bucher W., Von Hahn H. P.—In: Myelination and Demyelination (ed. J. Palo), p. 147—157, New York, London, Plenum Press, 1978.
3. Matthieu J. M., Kuffer A. D.—In: Myelination and Demyelination (ed. J. Palo), p. 159—170, New York, London, Plenum Press, 1978.
4. Murray N., Steck A. J. J. *Neurochem.*, v. 43, p. 243—248, 1984.
5. Eylar E. H., Cazzam J., Jackson J. J., Westall F. C., Robinson A. B. *Science*, v. 168, p. 1220—1223, 1970.
6. Burger D. R., Vetto R. M. *Cell Immun.*, v. 70, p. 357—361, 1982.
7. Nye J. S., Voglmaiers S., Martenson R. E., Shider S. H. *J. Neurochem.*, v. 50, № 4, p. 1170—1178, 1983.
8. De Robertis E., De Lores Arnais G. R., Abberici M. *J. Biol. Chem.*, v. 242, p. 3487—3494, 1967.
9. Shoji S., Ohnishi J., Funakoshi T., Kubota Y., Fukunaga K., Miyamoto E., Ueki H. *J. Chromatog.*, v. 319, p. 359—366, 1985.
10. Turner R. S., Chou C.—H. J., Mazzer G. J., Dembure P., Kuo J. F. *J. Neurochem.*, v. 43, p. 1257—1264, 1984.

Поступила 3. I 1991

ПЕПТИДНАЯ КАРТА ГИПОТАЛАМУСА

ГАЛОЯН А. А., ЧАИЛЯН С. Г.

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

Гипоталамус представляет собой центр нейросекреторной деятельности организма. В областях *n. supraopticus* и *n. paraventricularis* образуются окситоцин и вазопрессин, а биосинтез нейросекреторных регуляторных гормонов гипоталамуса происходит в области *evinentia mediana* [1].

В последние годы из гипоталамуса различных животных Галояном и соавт. выделены коронароактивные вещества полипептидной природы. В дальнейшем были разработаны методы очистки этих биоактивных соединений, которые можно подразделить на три основные группы: коронарорасширяющие нейрогормоны К, G и C и их множественные формы [2—3], Ca^{2+} -независимые активаторы кальмодулинчувствительных ферментов под общим названием C-модулины [4] и аллостерические модуляторы активности кальмодулина—нейропептиды, условно обозначенные ПФ₁—ПФ₅ [5]. Как видно, гипоталамус служит источником неизвестных пептидных гормонов и биорегуляторов, которые до настоящего времени еще не выделены в чистом виде традиционными методами хроматографии.

В последние годы ВЭЖХ становится все более важным методом очистки и идентификации биологически активных соединений. Очевидно, что ВЭЖХ постепенно вытесняет многие классические методы, особенно на последних стадиях очистки, поскольку она превосходит старые методы по эффективности разделения, выходу продукта, скорости анализа и характеризуется высоким пределом обнаружения. Высокая степень разделения, которая достигается при помощи ВЭЖХ, делает этот метод пригодным для контроля чистоты и составления пептидных карт.

В настоящей работе приведены результаты по составлению пептидной карты вторичного порошка гипоталамуса (ВПП), позволяющего систематизировать большую группу биологически активных соединений гипоталамуса, обнаруженных в нашем отделе за последние 30 лет.

Эксперименты проводили на двухкомпонентной системе ВЭЖХ Biotronik BT-8100 (ФРГ). Система оснащена инжектором Rheodyne с использованием петли для образца объемом 50 мкл и детектором с изменяемой длиной волны. Спектральный диапазон дейтериевой

лампы 190—370 нм. Все растворы постоянно дегазировали для предупреждения образования пузырьков в системе. Для регистрации результатов хроматографии использовали систему хранения и поиска данных, включающую компьютер, АВМ АТ/РС 286. Для ВЭЖХ использовали колонки «Biosphere Si—300 C8, C18» и «Biosphere Si—100 C8 и C18» (4, 6×250 мм; «Bioservis», Армения и «Lichrosphere C18» ГГ).

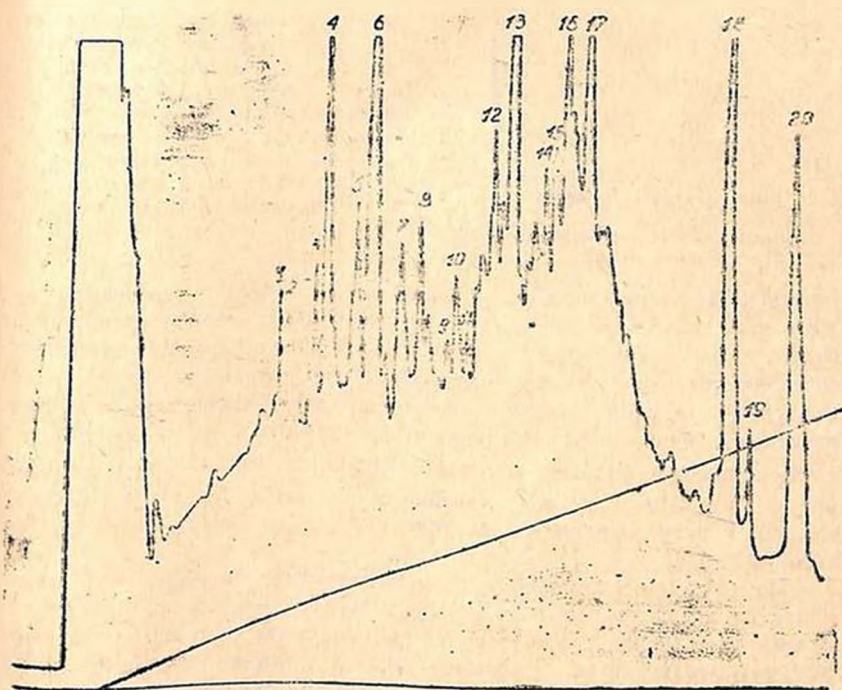


Рис. 1. Пептидная карта вторичного порошка гипоталамуса. Типичная хроматограмма на таандемной системе обращеннофазовых колонок Biosphere «Si—300 C8» и Biosphere «Si—100 C18». Элюцию осуществляли в режиме линейного градиента ацетонитрил /H₂O: 0,1% ТФУ при скорости потока 1 мл/мин за 80 мин. Обнаружение продукта при λ 210 нм.

Поскольку ВПГ содержит биоактивные соединения с большим диапазоном молекулярных масс, их разделение подразумевает применение колонок с дифференциальной пористой структурой. Для выбора оптимальных условий разделения был использован метод греко-латинского квадрата. Эксперименты, проведенные на колонке «Biosphere Si—100 C8 и C18», показали, что хроматография в режиме градиентного элюирования (ацетонитрил-вода, метанол-вода) в присутствии трифторуксусной кислоты (ТФУ) позволяет про-

водить разделение лишь с высокой эффективностью более гидрофобных соединений. Хроматография на колонке «Biosphere Si-300 C8» и «C18» в тех же условиях позволяла проводить эффективное разделение менее гидрофобных высокомолекулярных соединений. Следовательно, совмещение сорбентов с дифференциальной пористостью

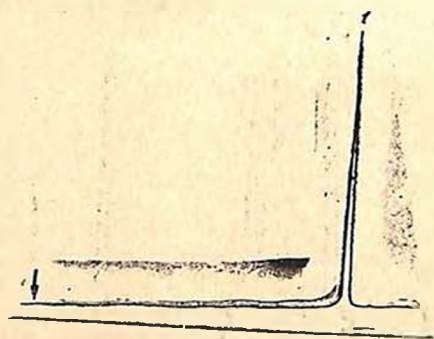


Рис. 2. Типичная рехроматограмма одного из выделенных соединений (пик № 18). Элюирование с колонки «Biosphere C18» (4,6 × 250 мм) осуществляли в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы, применялась смесь ацетонитрил (H₂O) 0,1% ТФУ (30—70%). Скорость потока 1 мл/мин, обнаружение при λ210 нм

структур было бы наиболее оптимальным, однако оно технически затруднено, поскольку происходит неоднородное распределение сорбентов с дифференциальной пористостью структур. Анализ полученных экспериментальных данных, основанный на методе греко-латинского квадрата, позволил оптимизировать процесс хроматографического разделения биоактивных соединений гипоталамуса на tandemной системе обращенно-фазовых колонок «Biosphere Si-300 C8» и «Biosphere Si-100 C18» в режиме линейно-ступенчатого градиентного элюирования с использованием ацетонитрил/вода в присутствии 0,1%-ного ТФУ.

На рис. 1 представлена типичная пептидная карта ВПГ. Как видно из хроматограммы, tandemная система колонок позволяет проводить селективное разделение по крайней мере 50-и пиков. Повторная рехроматография, типичный пример которого представлен на рис. 2, свидетельствовала о гомогенности полученных пиков, что позволило установить аминокислотный состав 20-и из представленных на пептидной карте ВПГ.

THE PEPTIDE MAPPING OF HYPOTHALAMUS

GALOYAN A. A., CHAILYAN S. G.

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Armenia, Yerevan

An high pressure liquid chromatography on tandem reversed phase „Biosphere Si—300 C8” and „Biosphere Si—100 C18” columns permitted to identify 50 ranges of the bioactive neuropeptides and determine the amino acid composition of some of them.

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.
2. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, т. 13, с. 9—38, 1978.
3. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, N 6, p. 769—787, 1985.
4. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э. Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 78—87, 1989.
5. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К. А., Закарян Т. Р. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.

Поступила 15. VI 1991

УДК 612.05:612.843.3

АНАЛИЗ ВКЛАДА РАЗЛИЧНЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ПУТЕЙ В БИОЭНЕРГЕТИКУ ОСНОВНЫХ ЗВЕНЬЕВ ВЕСТИБУЛЯРНОГО АНАЛИЗАТОРА

НАСИБУЛЛИН Б. А., *РОЗАНОВ В. А., ЯНОВСКИЙ М. Б.

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

*Всесоюзный НИИ гигиены водного транспорта

В состав вестибулярного анализатора входят образованные, относящиеся к различным отделам мозга и потому сформированные из различных типов нейронов. Рядом авторов проводились биохимические и гистохимические исследования окислительно-восстановительных процессов (ОВП) в неодинаковых по функции и цитоархитектонике отделах мозга [1—6]. Несмотря на это, отсутствуют данные о сравнительной характеристике ОВП в структурах, составляющих различные отделы мозга, но относящихся к звеньям одного анализатора.

В то же время, исходя из концепции структурно-функционального единства нейронных ансамблей, представляет интерес проблема согласованности метаболической (и особенно энергетической) деятельности различных структур, объединенных в единую сенсорную систему. При этом представляется целесообразным использовать некоторые приемы теории случайных функций [7] для оценки возможности существования тех или иных вариантов функционирования отдельных направлений ОВП.

В связи с этим нами предпринята попытка провести сравнительную характеристику состояния окислительно-восстановительного метаболизма основных звеньев вестибулярного анализатора.

Работа выполнена на 42 беспородных белых крысах-самцах, массой 200—240 г. Животных декалантировали, забой проводили в одно и то же время года и суток. Извлекали участки сенсомоторной коры, постероventrolateralного отдела таламуса, участок ствола мозга с передним вестибулярным ядром. Ткань мозга замораживали жидким азотом (-196°), из нее готовили криостатные срезы толщиной 11 мкм, на которых по прописям З. Лойда [8] определяли активность NADH·ДГ; NADPH·ДГ; СДГ; МДГ; β -ОБДГ; α -ГФДГ; ЛДГ; ГДГ; Г6ФДГ. Подбор ферментов определялся стремлением получить характеристику основных направлений окислительно-восстановительных реакций. Согласно устоявшимся представлениям, NADH- и NADPH-зависимые дегидрогеназы характеризуют общий уровень энергетики.

Содержание в популяции нейронов с разным уровнем активности ферментов (в %)

[illegible]

Результаты гистохимических реакций оценивали по методу количественной визуальной диагностики [9] с использованием 7-балльной шкалы оценки активности ферментов. В последующем нейроны с близкими значениями активности ферментов объединяли в общепринятые классы активности: А—слабая, В—умеренная, С—высокая, Д—очень высокая. Для более точной оценки состояния отдельных циклов окислительно-восстановительного метаболизма по уравнению Байеса [7] определяли вероятность сочетания уровней активности ферментов, характеризующих данный цикл. Полученные данные использовались для построения вероятностной картины взаимоотношений основных направлений ОВП в структурах вестибулярного анализатора.

Результаты наших исследований выявили неодинаковую активность изученных ферментов в нейронах разных мозговых структур, что создавало мозаичность гистохимической картины основных звеньев вестибулярного анализатора. Содержание нейронов с различными уровнями активности изученных ферментов в общей популяции в процентах от общего числа отражено в табл. 1: в подавляющем большинстве нейронов активность ферментов была умеренной или высокой. Следует заметить, что активность NADH-ДГ, СДГ, МДГ была высокой в 60—70% нейронов каждого из изученных отделов, активность остальных ферментов в таком же количестве нейронов этих же отделов была умеренной. От 0,5 до 2,5% от общего числа нейронов основных звеньев вестибулярного анализатора, независимо от отдела, обладали очень высокой активностью ферментов цикла Кребса и ГДГ; очевидно, в них в качестве энергосубстрата цикла Кребса используется углеродный скелет аминокислот.

Что касается Г6ФДГ, то по величине ее активности можно выделить 3 группы нейронов, численность которых незначительно различалась в разных звеньях вестибулярного анализатора. В 60—70% нейронов активность этого фермента умеренная, в 20—25% нейронов—высокая; в 9—12%—слабая. Поскольку Г6ФДГ—ключевой фермент пентозофосфатного пути (ПФП), который в основном обеспечивает энергией биосинтетические процессы, можно полагать, что в подавляющем большинстве нейронов изученных звеньев вестибулярного анализатора имеется гармоничное сочетание синтетических процессов и энергозависимых процессов обеспечения специфических функций. Вместе с тем, небольшая группа нейронов 2—3,6% от общего числа в разных отделах обладала слабой активностью NADPH-ДГ, что в сочетании с наличием нейронов со слабой активностью ферментов ПФП позволяет предполагать наличие нейронов, активно выполняющих специфическую функцию в ущерб биосинтезу.

Проведение вероятностного анализа для оценки состояния окислительно-восстановительного метаболизма в основных звеньях вестибулярного анализатора выявило значительное разнообразие форм этих процессов, что, очевидно, является биологической основой наблюдаемой мозаичности гистохимической картины.

Как видно из табл. 2, цикл трикарбоновых кислот действует

Таблица 2

Распределение вариантов сочетания активности изученных ферментов в отделах
вестибулярной системы интактных животных

Определяемое	Отдел	Вариант I	Вариант II	Вариант III	Вариант IV	Вариант V	Вариант VI
ЦДГ, мДГ	Cs	B:B=0,17	C:C=0,32	D:C=0,16	C:B=0,24	B:C=0,25	C:D=0,16
	Cl	B:B=0,19	C:C=0,3	D:C=0,16	C:B=0,22	B:C=0,26	C:D=0,15
	ThL	B:B=0,19	C:C=0,3	D:C=0,16	C:B=0,24	B:C=0,26	C:D=0,15
	nVA	B:B=0,18	C:C=0,31	L:C=0,18	C:B=0,2	B:C=0,29	C:D=0
НАГ, Н-Г, НАГ, Н-Г	Cs	B:B=0,29	C:C=0,2	C:B=0,35	D:B=0,2	C:A=0,16	B:C=0
	Cl	B:B=0,25	C:C=0,23	C:B=0,35	D:B=0,18	C:A=0,16	B:C=0
	ThL	B:B=0,23	C:C=0,23	C:B=0,35	L:B=0,19	C:A=0,18	B:C=0
	nVA	B:B=0,24	C:C=0,25	C:B=0,36	D:B=0,18	C:A=0,18	B:C=0
ГДГ		AAEB=0,35	BCCC=0,39	ACCC=0,23	CCBD=0,26		
		CCCD=0,17	BCCD=0,29	CCBB=0,1	BBBE=0,69		
	Cs	CCCC=0,27	CCBC=0,36	BBBD=0,46			
		CACC=0,23	AABV=0,35	ACBV=0,37	BBBE=0,69		
Л Г		AABC=0,31	CCCC=0,27	CCBD=0,27			
	Cl	AACC=0,22	CCCB=0,3	CCBC=0,38			
		ABBB=0,19	BABV=0,51	BVBD=0,52	BVBB=0,66		
		CBBC=0,39	BCBV=0,52	BCCC=0,46			
α-ГФДГ	ThL	CCBV=0,45	BACC=0,46	BVBA=0,53			
		ACCC=0,31	CCCB=0,33	AABV=0,26	BCCB=0,45		
		BACE=0,41	BABV=0,42	CCCC=0,34	BVBB=0,61		
	nVA	ACBV=0,31	CCBV=0,33	ABBV=0,45			

в каждом из звеньев вестибулярного анализатора — 6 вариантах, вероятность каждого из которых одинакова во всех звеньях вестибулярного анализатора. Два варианта — одинаковая активность СДГ, МДГ; два варианта — более высокая активность МДГ, чем СДГ; два варианта — более высокая активность СДГ, по отношению к МДГ. Биологический смысл указанных сочетаний состоит, по-видимому, в следующем: если СДГ и МДГ проявляют равную активность, цикл трикарбоновых кислот работает сбалансированно, а неодинаковый уровень активности ферментов, очевидно, свидетельствует о разной степени его интенсивности. Если активность СДГ преобладает, то можно предполагать активирование в ЦТК сукцинатоксидазного звена. Подобные изменения деятельности ЦТК наблюдаются при различных видах гипоксии и функциональном напряжении [10, 11]. Преобладание активности МДГ способствует удалению продуктов СДГ-реакции, что создает условия для ее более успешной деятельности, особенно, если учитывать возможность быстрой утилизации оксалацетата в трансаминазных реакциях [10, 11].

Выявляя возможную направленность окислительно-восстановительных процессов в основных структурах вестибулярного анализатора по активности $\text{NADH} \cdot \text{ДГ}$ и $\text{NADPH} \cdot \text{ДГ}$, мы обнаружили 5 значимых вариантов их сочетания. Наиболее вероятным было сочетание равных активностей этих ферментов на высоком и умеренном уровне. Биологический смысл этого, очевидно, состоит в гармоничном сочетании использования энергии ОВП для обеспечения специфических функций и синтетических процессов.

Рассматривая группу ферментов, ответственных за состояние процессов субстратного обеспечения ЦТК, можно заметить, что наиболее вероятны (0,60—0,69) сбалансированные поступления субстратов от углеводного, липидного и аминокислотного источников, реализуемых на разных уровнях интенсивности. Несколько меньше вероятность поступления субстратов двух видов обмена в ущерб двум другим. При этом преимущество отдается сочетанию углеводного и одного из других обменов, что характерно для всех звеньев вестибулярного анализатора.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что окислительно-восстановительный метаболизм в пределах каждого из звеньев интактного вестибулярного анализатора осуществляется в основном на двух уровнях: умеренном и высоком. Обеспечение субстратами основных энергетических процессов происходило всегда из нескольких источников. Способность к переключению исследуемых метаболических путей, очевидно, является основой для функциональной пластичности и высокой приспособляемости головного мозга, что может быть выявлено при изучении этих же параметров в условиях функциональной нагрузки и в процессе адаптации к неблагоприятным факторам внешней среды.

THE ANALYSIS OF THE DIFFERENT METABOLIC PATHWAYS: CONTRIBUTION IN THE BIOENERGETICS OF VESTIBULAR ANALYZER NEURONS

NASIBULLIN B. A., *ROZANOV V. A., YANOVSKIY M. B.

N. I. Pirogov Medical Institute, *All-Union Scientific-Research
Institute of Water Transport, Odessa

The activity of several dehydrogenases was measured histochemically in various parts of the vestibular analyzer. The character of distribution of the enzymes activity between the different neurons has been established. The probability of different combinations of enzyme activities characterizing alternative sources of energy supply was estimated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Fride R. L.* J. Neurochemistry, v. 5, № 2, p. 156—171, 1960.
2. *Fride R. L.* J. Neurochemistry, v. 6, № 3, p. 190—199, 1961.
3. *Fride R. L.* Topographic brain chemistry, New-York, 1966.
4. *Dunn A. I., Bondy S. C.*—In: The basic biochemistry of the brain, p. 23—30, New-York, 1974.
5. *Sokoloff L.*—In: Basic neurochemistry, p. 299—326, Boston, 1972.
6. *Паллидин А. В.* Избранные труды, Киев, АН УССР, 1975.
7. *Пугачев В. С.*—В кн.: Теория случайных функций, М., Физматгиз, 1962.
8. *Лойд Э.* Гистохимия ферментов, М., Мир, 1982.
9. *Стефанов С. Б.* Арх. анатом. гистол., эмбриол., № 2, с. 18—23, 1985.
10. *Кондрашова М. Н.*—В кн.: Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена, Материалы Всесоюзного симпозиума (1986, июнь, Пушкино), с. 140—153, Пушкино, 1987.
11. *Кондрашова М. Н.*—В кн.: Молекулярные механизмы клеточного гомеостаза, с. 40—46, Новосибирск, Наука, 1987.

Поступила 27. X. 1990

УДК 612.570

ВЛИЯНИЕ ГЛИКОПРОТЕИНОВ НА
ТРАНСКРИПЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ЯДЕР
НЕЙРОНОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

САИТМУРАТОВА О. Х., ЛЕОНТЬЕВ В. Б.

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

Процесс транскрипции в изолированных клеточных ядрах широко используется для изучения механизма действия на активность хроматина многих регуляторных факторов, в частности белков, пептидов и гормонов. В настоящее время установлено тормозящее действие гистонов на транскрипцию в изолированных ядрах клеток. В частности, показано, что гистон H_3 ингибирует синтез РНК сильнее, чем фракция гистона H_1 [1], что особенно отчетливо выражено в ядрах тканей головного мозга. Обнаружено, что низкомолекулярные пептиды также могут подавлять транскрипционную активность ядерного хроматина [2]. Некоторые гормоны, в частности гидрокортизол, тироксин и инсулин, напротив, стимулируют эндогенный синтез РНК [3—7]. Стимулирующий эффект на РНК-полимеразную активность отмечался при действии этанола [8] и взаимодействии гормон-рецепторного комплекса с ядрами клеток печени крыс [9].

Однако исследование действия данных препаратов на РНК-полимеразную активность ядер проводилось с делящимися клетками как животных, так и растений. Подобные исследования, выполненные на ядрах неделящихся клеток, встречаются крайне редко.

Ранее нами было показано, что гликопротеины, синтезированные в ядрах нейронов головного мозга, стимулируют двигательную активность животных при внутрибрюшинном введении [10], а при непосредственном введении в мозг усиливают как двигательную активность, так и поведенческие реакции животных [11]. Однако эти результаты пока не дают окончательного ответа на вопрос о функциональном значении этих гликопротеинов.

В данной работе представлены данные о влиянии двух гликопротеинов с M_r 25—30 кД (I) и 10—15 кД (II) на РНК-полимеразную активность ядер нейронов.

В опытах использовали гликопротеины, синтезированные *in vitro* ядрами клеток нейронов головного мозга кроликов [12]. ДНК в пробах определяли по Спирину [13], РНК-полимеразную активность

изолированных клеточных ядер нейронов—общепринятым методом. Для этого готовили пробы, содержащие 0,2 мл ядерной суспензии (200—300 мкг белка) в 0,25 М сахарозе, 4 мМ $MgCl_2$, 0,01 М трис-HCl буфер, pH 8,3; 0,3 мл смеси VTP, GTP и CTP (по 0,2 мМ), 50—100 мкг гликопротеинов и 0,0029 мкМ $[^3H]$ АТР. Пробы инкубировали 10 мин при 37°, охлаждали, добавляли 5%-ную ТХУ. Осадки промывали 5%-ным раствором ТХУ на миллипоровых фильтрах («Synpro», Чехословакия), затем охлаждали спиртом. Фильтры высушивали на воздухе и пересчитывали на сцинтилляционном счетчике. Об уровне синтеза РНК судили по включению $[^3H]$ АТР в кислото-нерастворимую фракцию. Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики по Менцевичоте и Эрингене [14].

Таблица

Влияние гликопротеинов, синтезированных в ядрах, на РНК-полимеразную активность ядер нейронов головного мозга кроликов

Серия опытов	Концентрация гликопротеина, мкг/мл	Радиоактивность, нмп/мин на мг ДНК	% включения $[^3H]$ АТР
Контроль	—	1400±50	100
Гликопротеин с Мг 25—30 кД	50	1000±28	71
	75	463±87	33
	100	429±50	30
Контроль	—	1400±50	100
Гликопротеин с Мг 10—15 кД	50	446±65	31
	75	180±15	13
	100	180±10	13

Примечание. Все различия по отношению к контролю достоверны при $p < 0,05$.

Данные, полученные при определении РНК-полимеразной активности, представлены в таблице. Показано, что оба ядерных гликопротеина в используемых концентрациях (50,75 и 700 мкг/мл) подавляют РНК-полимеразную активность ядер. Гликопротеин I в концентрации 50 мкг/мл снижает активность фермента на 30%. При повышении концентрации его подавляющий эффект постепенно увеличивается и достигает 70% при концентрации 100 мкг/мл.

Аналогичную концентрацию мы наблюдали с гликопротеином II. Надо отметить, что его действие выражено сильнее, в его присутствии РНК-полимеразная активность ингибируется на 85%. По нашим данным, ядерные гликопротеины усиливают двигательную активность [10] и подавляют РНК-полимеразу ядер *in vitro*. Нужно отметить, что по своему действию на РНК-полимеразную активность они подобны гистонам H_1 и H_3 , что свидетельствует о влиянии ядерных гликопротеинов на функциональное состояние хроматина. Возможно, что эти гликопротеины являются полифункциональными активными белками.

EFFECT OF GLYCOPROTEINS UPON THE TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY OF BRAIN NEURONS NUCLEI

SAITMURATOVA O. H., LEONTJEV V. B.

A. S. Sadykov Institute of Bioorganic Chemistry, Academy of Sciences of the Uzbek SSR, Tashkent

The effect of different concentrations (50, 75 and 100 $\mu\text{g/ml}$) of two glycoproteins with M_r 25–30 kD (I) and 10–15 kD (II) on RNA polymerase activity of the brain neurons nuclei have been studied *in vitro*. The both glycoproteins in the used concentrations significantly suppressed the RNA polymerase activity, although the effect of glycoprotein II was stronger.

ЛИТЕРАТУРА

1. Джохадзе Д. И. Биохимические особенности клеточных ядер различных тканей. Тбилиси, Мецнереба, 1977.
2. Gianfranceschi Gian Luigi. Blochim et Blophys Acta, v. 699, № 2, p. 138–148, 1982.
3. Джохадзе Д. И., Гоглидзе Р. И., Раквишвили Н. П. Укр. биохим. журн., т. 47, № 3, с. 299–306, 1975.
4. Маковоз Р. К., Зильберман С. Ц. Актуальн. пробл. возраст. физиол. биохимии и биофиз. Киев, с. 86–88, 1979.
5. Константинова И. Д. Молекуляр. биология, т. 5, № 5, с. 1011–1015, 1981.
6. Matsu Hidenori, Suzuki Nakiaki, Hosoka Tolercho Endocrinol. Jap., v. 35, № 5, p. 697–704, 1988.
7. Зильберман С. Ц. Тезисы Съезда геронтологов и геронтологов (Днепропетровск). Киев, с. 89–90, 1988.
8. Божко Г. Х., Хоменко Е. И. Укр. биохим. журн., т. 61, № 1, с. 48–52, 1989.
9. Адылова А. Т., Галафутдинова Е. А. Пробл. эндокринологии, т. 32, № 5, с. 69–72, 1986.
10. Сaitмуратова О. Х., Рустамова Ф. Н., Садыков А. А., Леонтьев В. Б. Нейрохимия, т. 6, № 3, с. 360–367, 1987.
11. Сaitмуратова О. Х., Хазбиевич И. С., Насыров С. Х. ДАН УзССР, № 9, с. 46–48, 1986.
12. Сaitмуратова О. Х. Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 70–77, 1959.
13. Спирин А. С. Биохимия, т. 23, с. 656–662, 1959.
14. Монсвичюте Е. В., Эрингеле Е. В. Патол. физиология и эксперим. терапия, т. 8, № 4, с. 71–78, 1964.

Поступила 20. I 1991

ОБЗОРЫ

УДК 612.8.015+591.484/488

О МОЛЕКУЛЯРНОЙ СТРУКТУРЕ НЕЙРОРЕЦЕПТОРОВ

ЭТИНГОФ Р. Н.

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

Рассмотрены возможности и ограничения разных методических приемов (молекулярно-генетические, иммунохимические, фармакологические) изучения молекулярной структуры нейрорецепторов. Обсужден вопрос о трудностях классификации последних в связи с гетерогенностью их популяций, разнообразием механизмов трансдукции сигналов, а также тканевой, региональной и возрастной особенностями нейрорецепторов и составляющих их субъединиц. Проанализированы некоторые аспекты проблемы взаимодействия рецепторов с их лигандами (вопрос о варибельности средств к нейрорецепторам, возможности изменения их эндогенной концентрации, подобия принципов взаимодействия в отдельных группах рецепторов). Отмечены новые тенденции изучения молекулярной структуры рецепторов, состоящих из субъединиц, в частности, вопрос об их функциональной самостоятельности.

Молекулярная структура многих нейрорецепторов, например, β -адренергического, никотинового и мускаринового холинорецепторов β -адренергического, никотинового и мускаринового холинорецепторов (НХР и МХР), ГАМК_A, серотонинового и ряда других изучена весьма подробно. За последние годы некоторым из нейрорецепторов и их группам были посвящены специальные монографии и обзоры [1—9]. Значительные успехи в изучении молекулярной природы рецепторов обусловлены широким применением для исследования этой проблемы молекулярно-генетических, иммунохимических, фармакологических, различных вариантов физико-химических и других методов анализа, используемых в современной молекулярной биологии. На фоне имеющихся успехов, однако, выясняется, что возникли и определенные трудности в трактовке полученных результатов, обусловленные, с одной стороны, некоторыми ограничениями используемых методов анализа, а с другой — теми возможностями, которые последние открывают. Так, например, при помощи молекулярно-генетических способов анализа непрерывно обнаруживают новые варианты отдельных нейрорецепторов и их субъединиц. Число классов, типов, подтипов, групп и т. д. нейрорецепторов все время увеличивается. Описаны и новые, подобные по структуре нейрорецепторам, белки (рецепторы), лиганды для которых пока неизвестны [10, 11]. Неоднократно также показано, что многие из нейрорецепторов осуществляют передачу

сигнала при помощи различных механизмов [12]. Эта сложность отражена даже в названиях отдельных статей [13—15] и является предметом специальных дискуссий [16, 17]. В результате такой ситуации весьма актуальным стал вопрос о классификации нейрорецепторов.

Помимо многовариантности структуры и механизмов передачи сигналов, присущих почти всем нейрорецепторам, в отдельных экспериментальных работах намечены и некоторые подходы для изучения новых вопросов, связанных с функцией нейрорецепторов. Это касается, к примеру, возможной самостоятельной значимости отдельных рецепторных субъединиц, полифункциональности рецепторных молекул, сложностей оценки сродства к лигандам и т. д.

Цель настоящего обзора—краткое обобщение некоторых (отнюдь не всех) аспектов проблемы молекулярной структуры нейрорецепторов, причем преимущественно тех вопросов, которые пока менее других проанализированы в литературе. В качестве примеров при рассмотрении отдельных положений использованы в сенсном материалы по тем рецепторам, степень изученности которых позволяет обсуждать общие вопросы.

Методические аспекты: гетерогенность популяций нейрорецепторов, множественность путей трансдукции сигналов, проблема классификации

Одним из весьма широко используемых в последние годы методов исследования молекулярной природы нейрорецепторов является клонирование их генов в разных искусственных условиях с целью синтеза белка рецептора и изучения деталей его структуры. Иногда клонированию подвергаются разные образцы ДНК, выделенных из соответствующих тканей. Для идентификации роли отдельных доменов нейрорецепторов на разных стадиях рецепторного процесса (связывание лиганда, взаимодействие с другим белком, модификация рецептора и т. д.) получают обычно мутанты рецепторов, из молекул которых изъяты отдельные участки или они заменены другими аминокислотами. Кроме указанных, имеются и другие варианты мутаций рецепторных молекул [6]. Проверая функциональную активность мутантов, оценивают значимость отдельных доменов рецепторных молекул для осуществления разных стадий рецепторного процесса, а также их реактивность к различным агонистам и антагонистам.

Использование молекулярно-генетических методов анализа применительно к нейрорецепторам позволило выявить гетерогенность их популяций, а также обнаружить новые белки, подобные по структуре нейрорецепторам. Так, например, белок, подобный МХР, был обнаружен в мозжечке и других тканях [10]. В опытах по клонированию генов, полученных из ткани мозга, было показано образование еще одного нового белка (рецептора?), сопряженного с GTP связывающими белками (G-белки) и имеющего структуру, подобную рецепто-

рам этого типа. По мнению авторов статьи, новый белок относится к семейству нейропептидных рецепторов [11].

Число сообщений о разных вариантах ранее известных нейрорецепторов возрастает ежемесячно. Так, показано наличие нового варианта серотонинового рецептора [18], пятого варианта МХР [19], двух дополнительных вариантов рецепторов катехоламинов [20], идентифицированы и характеризованы в мозгу два субтипа α_1 -адренергического рецептора [21], выяснено, что образование глутаматных рецепторов обеспечивается, по крайней мере, пятью генами [22], установлено наличие в мозгу второго варианта дофаминового рецептора [23], клонированы новые варианты α -субъединицы НХР [24, 25]. Число таких примеров можно существенно увеличить.

При анализе этих данных возникает ряд вопросов: в какой мере полученные *in vitro* белки соответствуют тем, которые имеются *in vivo* и подобны ли между собой нейрорецепторы, синтезированные в различных условиях? По-видимому, это не всегда так, поскольку варьируют кариотипы клеток, используемых для культивирования, а также условия их роста. Поэтому, вероятно, не случайно, что β_2 -адренергические рецепторы человека, экспрессированные в разных клетках, отличались примерно на порядок по сродству к лиганду [26]. Вообще при синтезе белка рецептора в искусственных условиях у него могут появляться новые свойства, так, например, рецептор серотонина, культивируемый в фибробластах в присутствии своего лиганда, оказался протоонкогеном [27].

Что касается мутантов рецепторов, то их использование внесло существенный вклад в идентификацию функциональных доменов рецепторных молекул [5, 12, 26, 28]. В то же время в ряде случаев трактовка результатов, полученных при помощи мутантов, не всегда однозначна. Функциональная дефектность мутантов может быть обусловлена не прямой необходимостью измененного участка рецептора для осуществления отдельных стадий рецепторного процесса, а структурной реорганизацией молекулы благодаря модификации ее первичной структуры [29]. Так, при использовании мутантов β_2 -адренорецептора была установлена необходимость ряда аминокислот у СООН-конца молекулы для ее связи с α_1 -субъединицей G-белков. В то же время, применяя в качестве конкурентов этого участка небольшие пептиды, в которых полностью копирована последовательность расположения аминокислот изучаемого домена, вышеуказанное заключение не было подтверждено. Авторы этой работы полагают, что причиной разных выводов являются конформационные изменения молекулы, имевшие место в работе с мутантами [30]. По образному выражению исследователей этого направления, результаты, полученные на мутантах, позволяют выявить не те участки молекулы, которые необходимы для функционирования рецептора, а скорее те его домены, которые не принимают в этом участия [31]. х

Уже было указано выше о возможности применения для идентификации функциональных доменов рецепторных молекул, неболь-

ших пептидов, копирующих отдельные участки рецептора и соответственно являющиеся их конкурентами. Этот метод, широко применяемый в последние годы, удобен тем, что сама по себе исследуемая молекула не подвергается воздействиям, то есть сохраняет нативные свойства. Однако в данном случае возникают сомнения другого рода — в какой мере идентичны реакционные возможности целой молекулы и ее небольшого фрагмента, представленного пептидом.

Большое количество работ по изучению субмолекулярной структуры рецепторов проведено при помощи моноклональных антител. Последние применяют, как правило, для блокады и соответственно идентификации отдельных функциональных участков рецепторов. Однако и этот способ исследования, при помощи которого был получен ряд важных данных, не лишен недостатков, которые особенно реальны в тех случаях, когда имеют дело не с очищенными белками рецепторов, а с тканевыми препаратами. В этом случае нет полной уверенности в достаточной специфичности взаимодействия моноклонального антитела с отдельными участками рецепторных молекул, так как существуют подобные по первичной структуре участки в других рецепторах, а также в иных по функциям белках. Неожиданное наличие аналогичных эпитопов в самых различных белках отмечено во многих случаях; значение этого феномена неясно [32].

Взаимодействие моноклонального антитела с отдельными рецепторами определяется и тканевой специфичностью последних, а также возрастом животных, поскольку в ряде случаев показаны изменения в структуре рецепторов по мере развития животных (см. ниже). Примером недостаточной специфичности взаимодействия моноклональных антител с конкретным рецептором могут служить результаты работы, в которой было отмечено, что антитела, полученные к участкам цитоплазматической области родонина сетчатки, были пригодны для выявления подобной области и в β_2 -адренергическом рецепторе [33], что, по-видимому, характерно для многих рецепторов. Так, антитело, полученное к синтетическому пептиду, соответствующему по структуре участку с СООН-конца одного представителя β_2 -адренергического рецептора, полученного из легкого хомяка, взаимодействовало с целым набором рецепторов мозжечка крысы [34].

Помимо не всегда достаточной специфичности взаимодействия моноклонального антитела с изучаемым рецептором нужно, по-видимому, учитывать также, что присоединение антитела к рецептору определяется, в случае работы с тканевыми препаратами, не только структурой участков рецепторных молекул, но и микроокружением рецептора, его доступности, степени модификации и т. д. И, наконец, взаимодействие моноклонального антитела с рецепторной молекулой приводит, естественно, к изменению ее конформации. Соответственно функциональная дефектность связанных с моноклональными антителами рецепторов может носить, как и в случае с мутантами рецепторов, вторичный характер, что, естественно, затрудняет идентификацию функциональных доменов.

Несмотря на отмеченные ограничения использования моноклональных антител для изучения молекулярной структуры нейрорецепторов, возможности иммунохимических способов их изучения еще не исчерпаны и, по-видимому, в ближайшее время будут применяться новые варианты этих методов. Этот вопрос весьма актуален и потому, что в организме животных обнаружены эндогенные аутоантитела к отдельным нейрорецепторам и необходимо изучать их роль [35].

Активно развивается в последние годы и относительно изученное направление исследований по фармакологической характеристике нейрорецепторов. На основе реактивности последних к агонистам и антагонистам приходят к заключению о новых вариантах рецепторов, часто используя этот параметр в качестве критерия для классификации рецепторов. В ряде случаев это оправдано, особенно, когда удается подобрать сугубо избирательные лиганды.

Однако такая ситуация имеет место не всегда, принимая во внимание наличие подобных эпипептидов в ряде рецепторов, а также, как, например, в случае рецепторов, связанных с G-белками, их одинаковую укладку в мембране, отмечено, что один и тот же агонист может иметь примерно одинаковое сродство к разным рецепторам — например, серотониновому, дофаминному и гистаминному [26, 36]. С другой стороны, рецепторы одного типа (например, квискилатные, являющиеся подтипом глутаматных) отличаются разными фармакологическими свойствами [37]. Вообще имеется точка зрения, что сродство рецепторов к лигандам является лабильным параметром и не может служить основой для классификации рецепторов [38].

В ряде случаев взаимодействие рецептора с тем или иным лигандом и их разными производными используют для оценки структуры рецепторных молекул и поиска наиболее эффективных регуляторов рецепторной активности. В настоящее время, однако, полагают, что более оправдан другой путь: вначале необходимо исследовать молекулярную структуру рецептора, получить представление о возможных «посадочных площадках» для изучаемых лигандов, и на основании уже этих данных целенаправленно подбирать модуляторы активности рецепторов [36].

В то же время исследование фармакологической реактивности нейрорецепторов, в частности изучение их взаимодействия с разными радиолигандами, оказалось весьма удобным приемом для изучения локализации типов рецепторов (например, глутаматных) в отдельных структурах мозга [39]. Возможности фармакологических способов изучения отдельных свойств нейрорецепторов, естественно, не исчерпаны; большое значение они имеют и в прикладном аспекте.

Специфические блокаторы рецепторов применяют и для дифференциации различных механизмов трансдукции сигнала, что характерно почти для всех нейрорецепторов. Вопрос о многовариантности путей трансдукции сигналов является в настоящее время одним из наиболее актуальных [5, 6, 12, 40]. Почти по каждому рецептору регулярно появляются новые сведения в этом направлении, ряд из

которых имеет принципиально важное значение. Так, представляется весьма существенным, что традиционная цепь передачи сигнала, характерная для нейрорецепторов, функционирующих при участии G-белков, может быть существенно редуцирована. Показано, что α -субъединица G-белков в ряде случаев выполняет функцию посредника, взаимодействуя с белком канала и обуславливая изменение его ионной проницаемости [40]. Частичная редукция цепи передачи сигнала при участии G-белков отмечена и для сенсорных рецепторов (в фоторецепторах сетчатки и обонятельных клетках позвоночных). Показано, что в данном случае изменение ионной проницаемости каналов осуществляется благодаря непосредственному присоединению посредников (циклические нуклеотиды) к белку ионного канала; таким образом, предварительный этап—обычный для многих систем подобного рода (изменение за счет посредников активности фосфопротеинкиназ и как следствие степени фосфорилирования белков канала) может быть исключен. Необычность молекулярной структуры белков каналов сенсорных клеток подтверждает возможность своеобразия и путей трансдукции сигналов [41].

Другим важным фактом, имеющим, вероятно, большое значение в плане «настройки» рецептора в процессе трансдукции сигналов, является обнаружение фосфатазной активности в одной из субъединиц опнатного рецептора [42]. Наличие ферментативной активности непосредственно в молекуле рецептора открывает новые перспективы для исследования вопроса о «саморегуляции» рецепторного каскада реакций уже на стадии рецептора.

Из других феноменов, связанных с механизмами трансдукции сигналов, следует отметить, что существенно расширился спектр их альтернативных вариантов, присущих разным нейрорецепторам. Так, показано, что серотониновый рецептор, функционирующий обычно при участии разных G-белков, в отдельных случаях может быть сам по себе белком ионного канала [2]. С другой стороны, типичный «канальный» рецептор—глутаматный функционирует и при участии G-белков и посредников [12, 39]. Таким образом, семейство «смешанных» нейрорецепторов (НХР и МХР, ГАМК_A и ГАМК_B рецепторы) значительно увеличилось.

Многовариантность молекулярной структуры нейрорецепторов, множество генов, обуславливающих образование нейрорецептора, связывающего один лиганд, трудности трактовки результатов, полученных с помощью фармакологических методов анализа, разнообразие путей трансдукции сигналов чрезвычайно затрудняет вопросы их классификации. До сих пор нет четких критериев, позволяющих с достаточным основанием отнести те или иные рецепторы к отдельным группам, классам, типам и т. д. Вопрос осложнен и тем, что молекулярная структура рецепторов и их свойства динамичны и зависят от возраста животных, а также ткани (и ее регионов), в которых они локализованы (см. ниже). По-видимому, для полноценной классифи-

кации рецепторов необходимо не только использовать всю совокупность характеризующих их параметров, но и разработать новые подходы.

Некоторые общие вопросы, связанные с молекулярной структурой нейрорецепторов

К настоящему времени накопились сведения по молекулярной структуре многих нейрорецепторов. Так, например, расшифрована первичная структура порядка пятнадцати рецепторов, функционирующих при участии G-белков (α_1 - α_2 , β_1 , β_2 -адренергические, разные варианты МХР, серотонинового и др.) [5], относительно недавно определена структура одного из дофаминовых рецепторов [43]; так же подробно изучена первичная структура «канальных» рецепторов—отдельных субъединиц НХР, ГАМК_A рецепторов, начато подробное исследование первичной структуры глутаматных рецепторов [7—9, 22, 44].

Совокупность полученных данных позволяет обсудить некоторые общие вопросы молекулярной структуры нейрорецепторов, а также подобие их по отдельным свойствам другим рецепторам. В этом плане представляет интерес тот факт, что при изучении формирования одного из нейрорецепторов (НХР) и других рецепторов (инсулинового, эпидермального фактора роста) было выяснено, что посттрансляционный механизм их активации более или менее одинаков. Все эти рецепторные белки появлялись в эндоплазматическом ретикулуме и прежде чем встроиться в мембрану и приобрести способность связывать лиганд, подвергались N-гликозилированию; одновременно происходило перераспределение дисульфидных связей и образование ансамблей субъединиц, составляющих рецепторы [45]. Необходимость углеводной приставки к белку рецепторов для обеспечения связывания лигандов показана и для других рецепторов, например, аденозинного, причем природа углеводных остатков у разных вариантов этого рецептора оказалась различной [46]. Полагают, что присоединение углеводного компонента к белку рецептора необходимо для его включения в мембрану и его структурной ориентации [45]. Таким образом, можно полагать, что несмотря на разную природу отдельных рецепторов и различные механизмы трансдукции сигналов имеется ряд общих принципов их структурной организации.

Одной из центральных функций рецептора является связывание лигандов. Вопрос об идентификации доменов рецепторных молекул, обеспечивающих реализацию этой функции, был изучен с помощью всех вышеуказанных методов анализа. Было установлено, что все рецепторы, функционирующие при участии G-белков и имеющие подобную молекулярную структуру (семь трансмембранных «столбов», соединенных гидрофильными «петлями») характеризуются в принципе весьма схожими механизмами связывания лиганда. Особенно подробно этот механизм изучен для β -адренергического рецептора. Ока-

залось, что ключевое значение для присоединения лиганда имеют дикарбоновые аминокислоты и, в частности аспарагиновая кислота (Asp^{112}) третьего трансмембранного сегмента [5]. В многочисленных опытах с мутантами рецепторов показано, что исключение из второго и третьего сегментов молекулы одной из аспарагиновых кислот (или замена их на другие) приводило к существенным изменениям в связывании лиганда.

Обеспечение связей лигандов с рецепторами этой группы обусловлено взаимодействием COOH групп дикарбоновых аминокислот с NH_2 группами агонистов. При этом, естественно, нельзя исключить роль и других участков молекулы и ее конформационного состояния для осуществления этого важнейшего этапа рецепторного акта [2, 12, 26, 36].

Относительно подробно исследован вопрос о присоединении лигандов к нейрорецепторам другого типа—именно тех, которые, обладая способностью к связыванию лигандов, одновременно формируют ионный канал. Выяснено, что для полноценной активации подобных рецепторов (одного из типов глутаматного НХР, ГАМК_A рецепторов) необходимо множество молекул агонистов. Предложена схема исследовательских этапов активации рецептора, по которой эту группу рецепторов можно выделить в специальный класс [47].

Связывание лигандов в этой группе рецепторов, состоящих из отдельных субъединиц, осуществляется, как показано, например, на НХР и ГАМК_A рецепторах разными субъединицами, причем в случае первого отмечена решающая роль для активации рецептора присоединения лиганда именно к его α -субъединице. Как оказалось, α - и β -субъединицы ГАМК_A рецептора имеют разное сродство к агонистам и разную чувствительность к антагонисту [9, 24, 48—50].

Что касается идентификации доменов субъединиц, взаимодействующих с лигандом, то использование различных «зондов» (моноклональные антитела, α -бунгаротоксин, синтетические пептиды) применительно к НХР позволило выяснить, что для присоединения АХ необходимы два или более разных участков, расположенных в N-концевой внеклеточной области молекулы. Выявлена и значимость для взаимодействия лиганда с рецептором конкретных аминокислот, в частности, некоторых тирозинов и цистеинов [49], которые, по-видимому, обеспечивают определенную конформационную структуру молекулы. В связи с этим надо отметить, что и в случае рецепторов, представленных одной полипептидной цепью и функционирующих при участии G-белков (β -адренорецептор), показана роль цистеинов для поддержания конформационного состояния молекул, что необходимо для полноценной активации рецептора [51].

Хорошей проверкой значимости отдельных элементов структуры рецепторов для связывания лигандов является возможность предсказания связи рецептора с различными производными агонистов или антагонистов. Такая работа с учетом разных факторов, обеспечивающих связывание лигандов (физико-химические свойства рецептора, его

трехмерная структура и др.), проведенная с 29-ью производными лигандов на бензодиазепиновом рецепторе, дала весьма обнадеживающие результаты [52].

При обсуждении проблемы связывания лигандов рецепторами естественно возникает вопрос: чем определяется степень сродства рецептора к агонистам (а также к антагонистам) помимо особенностей его первичной и пространственной структуры. Следует отметить, что последняя может несколько варьировать в разных тканях мозга и отдельных его регионах, а также в зависимости от возраста животных (см. ниже). Кроме того, существенное значение в этом плане имеет наличие специальных регуляторов связывания, липидное микроокружение рецепторов, их число, ионный состав, G-белки, модификации рецепторного белка и т. д. [12, 38, 53]. Важны и условия проведения экспериментов—так, например, при солибилизации рецептора может меняться его сродство к лигандам [54]. Отмечено также, что при очистке рецепторов их сродство к лигандам в ряде случаев уменьшалось в 10—60 раз [38]. Авторы последней работы полагают, что сродство рецепторов к лигандам является переменным параметром и не может служить основой для классификации рецепторов. По их мнению, различная в разных тканях аффинность рецептора, связывающего один лиганд, регулируется специальными системами.

К вопросу о сродстве рецепторов к лигандам прямое отношение имеет количество последних, непосредственно взаимодействующих с узнающими участками рецепторной молекулы. В опытах *in vivo* и при работе с тканевыми препаратами следует, по-видимому, учитывать различные возможности изменений концентраций применяемых лигандов. Это связано с наличием в исследуемых структурах, наряду с рецептором, ряда белков, связывающих тот же лиганд. Такие белки, например, имеются в синаптических везикулах серотониновых нейронов, а также в других нервных клетках мозга. Эти белки подробно изучены; предполагают, что они играют роль возможного депо серотонина [55]. Показано также наличие глутаматсвязывающих белков, не сопряженных с ионными каналами в одном из штаммов нейробластомных клеток [56]. Число таких примеров можно существенно увеличить, причем белки, связывающие лиганды рецепторов, обнаружены в рецепторных и неактивных к данному стимулу тканях. Степень их сродства к лигандам и число связывающих участков может быть даже больше, чем в истинном рецепторе [57].

Другим возможным путем изменений концентраций исследуемых лигандов в тканях могут быть их превращения; при этом возникают новые сигнальные молекулы разной эффективности. Таким превращениям придают большое значение в процессе рецепции одорантов и, в частности феромонов, порог чувствительности к которым весьма высок [58].

Вышеизложенные факты свидетельствуют о том, что вопрос о связывании лигандов нейрорецепторами, их узнающих участках, сте-

жени сродства и т. д. достаточно сложен. Поэтому вряд ли в однотипных экспериментах можно полностью оценить реальную ситуацию, имеющую место *in vitro*.

Для обеспечения функционирования рецептора необходимо не только связать лиганд, но и передать его для реализации биологического эффекта. В случае «канальных» рецепторов эта передача осуществляется в пределах одной молекулы, и механизм ее реализации является предметом обсуждений [8, 9, 47]. Много работ посвящено идентификации участков в молекулах нейрорецепторов, связанных в процессе своего функционирования с G-белками, в частности их α -субъединицами. Показано, что для взаимодействия рецептора с последними критическое значение имеют отдельные участки на СООН конце молекулы, а также ее общая конформация [2, 5, 26, 36]. Принцип контакта разных нейрорецепторов с α -субъединицами G-белков, по-видимому, более или менее одинаков. Однако вопрос осложняется тем, что большинство рецепторов подобного типа взаимодействует с различными G-белками; при этом в систему включаются разные ферменты, обеспечивающие выработку различных посредников (аденилатциклаза, гуанилатциклаза, ФДЭ, фосфолипазы C и A_2). Как было указано выше, возможно и прямое взаимодействие G-белков с белками ионных каналов. Чем определяется в каждом отдельном случае «выбор» того или иного пути трансдукции сигнала—пока не ясно, но значимость G-белков в этом плане бесспорна. По-видимому, потенциал отдельных субъединиц G-белков в рецепторных процессах значительно шире, чем имеющиеся к настоящему времени представления по этому поводу. Сейчас исследуют природу G-белков, обеспечивающих изменения проницаемости Ca^{2+} -каналов, активируемых без участия лигандов [6, 40, 59].

Резюмируя этот раздел, следует отметить некоторые общие консервативные черты, характерные для молекулярной структуры многих изученных нейрорецепторов разных типов. Это и роль углеводной «приставки» для внедрения рецепторов в мембрану и поддержания конформации рецепторных молекул, а также значение в этом плане дисульфидных мостиков за счет некоторых, входящих в их структуру молекул цистеинов. Последний феномен отмечен для НХР и для рецепторов, сопряженных с G-белками. В то же время группы нейрорецепторов, сходные по механизмам трансдукции сигналов, характеризуются существенным подобием и отдельных доменов первичной структуры. Это, в первую очередь, относится к ряду рецепторов, представленных одной полипептидной цепью; у них оказались сходными принципы взаимодействия с лигандами и с α -субъединицами G-белков [5]. Определенное подобие первичной структуры отмечено и для субъединиц «канальных» рецепторов—НХР, глутаматного, ГАМК_A [7, 8]. По-видимому, дальнейшее накопление сведений по молекулярной структуре нейрорецепторов позволит выявить как общие закономерности их молекулярной структуры, так и ее своеобразие, определяе-

мое, вероятно, в первую очередь механизмами трансдукции поступающих сигналов.

Общей чертой почти всех нейрорецепторов является, как уже было указано выше, крайняя гетерогенность их популяций и отдельных субъединиц. Как правило, синтез белка рецептора, а также его однотипных субъединиц, определяется семейством генов, и соответственно образующиеся белки отличаются по своей первичной структуре [7, 9, 50, 60]. Что же касается разных субъединиц, формирующих рецептор, то различия в данном случае весьма существенны. Степень подобия первичной структуры, например, субъединиц, входящих в состав ГАМК_A рецептора, составляла порядка 20—40% [7]. Отличаются отдельные субъединицы и по своим свойствам; помимо ранее отмеченной разницы в их сродстве к лигандам (ГАМК_A рецептор) [48], показано, что фосфорилирование отдельных субъединиц НХР осуществляется при помощи различных протеинкиназ [61].

Ряд данных, полученных в молекулярно-генетических экспериментах, существенно расширил представления и о числе субъединиц, присутствующих в тканях, например, НХР. Так, в нервной ткани была обнаружена своеобразная субъединица, не связывающая АХ. Была также выявлена возможность формировать НХР, сочетая отдельные субъединицы в разных комбинациях, включая в состав рецептора и несвязывающую АХ субъединицу [9, 24, 25, 50].

С чем же связана такая гетерогенность популяций нейрорецепторов и вариабельность составляющих их субъединиц? Бесспорное значение имеет тканевая и региональная специфичность рецепторов и возраст животных. Так, например, мРНК, участвующая в биосинтезе отдельных субъединиц НХР, по-разному локализована в различных отделах мозга. РНК, обеспечивающая биосинтез δ -1 субъединицы, сосредоточена преимущественно в полосатом теле, коре и мозжечке, а необходимая для образования γ -1—в клетках Пуркинье [9]. То же самое относится к субъединицам глутаматного рецептора: субъединица, связывающая каннат, обнаружена в коре мозга, мозжечке и гиппокампе, но не найдена в таламусе [62]. Отмечено и наличие разных субтипов α_1 -адренергического рецептора в отдельных структурах мозга [21]. Полагая, что один из типов серотонинового рецептора является доминантной формой в ЦНС, авторы показали наличие разных вариантов этого рецептора в различных структурах мозга: предположено, что разница в распределении субтипов серотонинового рецептора может определяться функциональными задачами и соответственно образованием разных посредников [63].

Возрастные изменения в наборе субъединиц в нейрорецепторах «канального» типа четко продемонстрированы на НХР и ГАМК_A рецепторе. В первом с возрастом происходила замена δ -субъединицы на ϵ [64]; во втором с развитием животных уменьшалось содержание β -субъединицы и возрастало содержание α -субъединицы. В течение развития животных показано и изменение сродства субъединиц этого рецептора к лигандам [60].

Совокупность приведенных данных свидетельствует о выраженной тканевой, региональной и возрастной особенностях отдельных нейрорецепторов и составляющих их субъединиц. В связи с этим очевидно, что отдельные субъединицы имеют разные функции; при этом нельзя исключить их самостоятельного значения. Так, например, отмечено, что один из вариантов субъединицы НХР может функционировать как ионный канал, также как отдельные субъединицы глицинового рецептора [9].

Большой интерес представляет вопрос и о существовании в рецепторных молекулах иных функций, помимо тех, которые прямо или косвенно связаны с рецепторным актом. Полифункциональность других белков (например, совмещение различных ферментативных активностей в АХЭ и глутаминназе) [12], наличие подобных эпитопов в первичной структуре белков, имеющих разные функции [32], позволяет считать это предположение не лишним оснований. Таким образом, потенциальные возможности рецепторных молекул значительно более многогранны, чем нам пока известно.

ABOUT NEURORECEPTOR MOLECULAR STRUCTURE: ADVANCES AND DIFFICULTIES

ETINGOF R. N.

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

The possibilities and the limitations of different (molecular-genetic, immunochemical, pharmacological) methods used to study the neuroreceptor molecular structure have been examined. The difficulties in neuroreceptors classification owing to the heterogeneity of their populations, the variety of signal transduction mechanisms, as well as to the tissue, regional and age peculiarities between receptors and their ligands (the affinity variations, the possible changes of endogene ligand concentration, the similarity of the interaction principles in separate receptor groups) have been analyzed. The new tendencies in the studies of the structure of molecular structure of neuroreceptors composed from the subunits and in particular, the problem of functional independence of the latter are noted.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шелковников С. А., Зеймаль Э. В. Мускариновые холинорецепторы. Л., Наука, 1989.
2. Hartig P. R. Trends Pharmacol. Sci., v. 10, p. 64—69, 1989.
3. The Opiate Receptors, Philadelphia, The Humana Press, 1988.
4. The α -2 Adrenergic Receptors, Philadelphia, The Humana Press, 1988.
5. Strader C. D., Sigal I. S., Dixon R. A. Faseb J., v. 3, p. 1825—1832, 1989.
6. Fretssmuth M., Casey P., Gilman A. Faseb J., v. 3, p. 2125—2131, 1989.
7. Olsen R. W., Tobin A. J. Faseb J., v. 4, p. 1469—1480, 1990.

8. Дамбинова С. А. Нейрорецепторы глутамата, Л., Наука, 1989.
9. Birdsall N. J. M. Trends Pharmacol. Sci., v. 10, p. 50—53, 1989.
10. Foss P. C. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 87, p. 3052—3056, 1990.
11. Eva C., Keinänen, Monyer H., Seeburg P., Sprengel R. FEBS Lett., v. 271 p. 81—84, 1990.
12. Этингер Р. Н. Успехи совр. биол., т. 111, № 3, с. 384—399, 1991.
13. Foster A. C., Fagg G. E. Trends Neurosci., v. 11, p. 17—18, 1987.
14. Malley K., Waddington J. Trends Pharmacol. Sci., v. 9, p. 385, 1988.
15. Steinbach J., Ifune C. Trends Neurosci., v. 11, p. 3—6, 1988.
16. Straupe P. G. J. Neurochem., v. 51, p. 1085—1091, 1990.
17. Waeldebeck M., Tastenooy M., Camus J., Christophore J. Mol. Pharmacol., v. 33, p. 267—273, 1990.
18. Conner D. A. Mol. Pharmacol., v. 37, p. 742—751, 1990.
19. Lido C. F., Burberis C., Themann A., Jomo R. J. Biol. Chem., v. 264, p. 7328—7337, 1989.
20. O'Dowd B. F., Nguyen T., Tirpak A., Jarvic K., Israel Y., Sceman P., Niznik H. FEBS Lett., v. 262, p. 8—12, 1990.
21. Terman B., Rich P., Grodzki A., Hess H., Graham R. Mol. Pharmacol., v. 37, p. 526—534, 1990.
22. Heinemann S., Bettler B., Boulter J., Deneris E., Hartley M., Hollman M., Papke R., Rogers S. J. Cell Biochem. Abstracts 19 Ulga Symp. Molec. and Cell Biol., p. 6, 1990.
23. Miller J. C., Wang Y., Filer D. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 166, p. 109—112, 1990.
4. Fornasari, Chini B., Tarroni P., Clementi F. Neurosci. Lett., v. 111, p. 351—356, 1990.
25. Isenberg K. E., Meyer C. E. J. Neurochem., v. 52, p. 988—991, 1989.
26. Venter J., Fraser C., Kertavage A., Buck M. Biochem. Pharmacol., v. 38, p. 1197—1203, 1989.
27. Ja'ini D., Livett T., Jessell T., Axel E. Science, v. 241, p. 1057—1062, 1989.
28. Buckley N. I., Hume E. C., Birdsall N. J. Biochem. Biophys. Acta, v. 1055, p. 43—54, 1990.
29. Ward W. H., Timms D., Fersht A. R. Trends Pharmacol. Sci., v. 11, p. 280—284, 1990.
30. Palm D., Munch G., Dees C., Hekman M. FEBS Lett., v. 264, p. 69—93, 1989.
31. Dohlman H., Garon M., De Blasi A., Friel T., Lefkowitz R. Biochemistry, v. 29, p. 2335—2341, 1990.
32. Doolittle R. F. Trends Biochem. Sci., v. 14, p. 244—245, 1989.
33. Weiss E., Hadcock J., Johnson G., Malbon C. J. Biol. Chem., v. 262, p. 4319—4326, 1987.
34. Romano W., Williams W., Fischbey D., Cocero N., Weiner D., Crune M., Molinoff P. J. Neurochem., v. 53, p. 362—370, 1989.
35. Ашмарин И. П., Фрейдлина И. С. Журн. эвол. биохимии и физиол., т. 25, с. 176—181, 1989.
36. Lefkowitz R., Kobitka B., Garon M. Biochem. Pharmacol., v. 38, p. 2941—2943, 1989.
37. Murphy S., Miller R. Mol. Pharmacol., v. 35, p. 671—680, 1989.
38. Bevan Y. A., Bevan R. D., Shreeve S. M., Faseb J., v. 3, p. 1636—1704, 1989.
39. Young A. B., Fagg G. E. Trends Pharmacol. Sci., v. 11, p. 126—132, 1990.
40. Benbaumer L., Abramowitz J., Crown A. M. Biochem. Biophys. Acta, v. 1031, p. 163—204, 1990.
41. Ludwig I., Margalit T., Eismann E., Lancet D., Kaupp U. FEBS Letter, v. 270, p. 24—29, 1990.
42. Wolleman W. Neurochem. Res., v. 12, p. 129—133, 1987.
43. Straupe P. C. Trends Neurosci., v. 13, p. 373—377, 1990.

44. Czajkowski C., Gibbs T., Farb D. H. *Mol. Pharmacol.*, v. 35, p. 75—84, 1989.
45. Olsen T. S., Lane M. D. *Faseb J.*, v. 3, p. 1613—1624, 1989.
46. Barrington W. F., Jacobson K. A., Stilles G. L. *Mol. Pharmacol.*, v. 38, p. 177—183, 1990.
47. Jaritt D. C., Pruscianto M. J., Zukin S. R. *Mol. Pharmacol.*, v. 37, p. 603—607, 1990.
48. Bureau M., Olsen R. *Mol. Pharmacol.*, v. 37, p. 497—502, 1990.
49. Conti-Tronconi B. M., Fen Fang, Diethelm B. M., Spencer S. R., Reinhardt S., Maelicke A. *Biochemistry*, v. 29, p. 6221—6229, 1990.
50. Bertrand D., Ballivet M., Kung'ur D. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, v. 87, p. 1993—1997, 1990.
51. Hausdorf W. P., Finatowich B., Fowd E. F., Caird M., Leflewitz R. J. *Biol. Chem.*, v. 265, p. 1388—1396, 1990.
52. Ghose A. K., Crippen G. M. *Mol. Pharmacol.*, v. 37, p. 725—734, 1990.
53. Klein W. L., Sullivan J., Skorupa A., Aquilar J. *Faseb J.*, v. 3, p. 2132—2140, 1989.
54. Casado V. J. *Neurosci. Res.*, v. 26, p. 461—473, 1990.
55. Yu P., Hsiung S. H., Kirchgessner A. L., Liu K. P., Girsken M. D., Tamir K. J. *Neurochem.*, v. 55, p. 1013—1022, 1990.
56. Berry B. W., Boland L., Hoch D., Dingledine P. J. *Neurochem.*, v. 51, p. 1176—1183, 1988.
57. Этингер Р. Н. *Биол. науки*, № 10, с. 37—48, 1987.
58. *Molecular Neurobiology of the Olfactory System*. N. Y., Plenum Press, 1988.
59. Shultz G., Rosenthal W., Hescheler J. J., Offermanns S., Schmidt A., Hinsh K., Spicher K., H.—S. *Biol. Chem.*, v. 371, p. 906—910, 1990.
60. Garrett K. M., Saito N., Duman R. S., Abel M. S., Ashton P. A., Fujimori S., Beer B., Tallman J. F., Vitek M. P. B. *Mol. Pharmacol.*, v. 37, p. 625—657, 1990.
61. Safran A., Provenzano C., Sagi-Eisenberg R., Fuchs S. *Biochemistry*, v. 29, p. 6730—6734, 1990.
62. Hampson D., Wheaton C., Dechesne K., Wenthold R. J. *Biol. Chem.*, v. 261, p. 1329—1335, 1989.
63. Julius D., Huang K., Livelli T., Axel R., Jessel T. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 87, p. 928—932, 1990.
64. Criado M., Koenen M., Lakmann B. *FEBS Lett.*, v. 270, p. 95—99, 1990.

Поступила 18. XII. 1990

УДК 577.176.6; 577.354.9; 577.112.4

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ β-АДРЕНЕРГИЧЕСКИХ РЕЦЕПТОРОВ

ВОЕЙКОВ В. Л.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

В обзоре рассмотрены современные представления о молекулярном строении β-адренергических рецепторов. Обсуждается роль отдельных аминокислотных остатков и участков первичной последовательности этих белков в их функционировании: способности специфично связывать лиганды и передавать сигнал о взаимодействии с агонистом на сопряженный G-белок. Приведены данные о молекулярных механизмах десенситизации рецепторов.

Эффекты, индуцируемые адреналином и норадреналином в нервных клетках и клетках периферических тканей, опосредуются адренергическими рецепторами (АР). Еще в 1948 г. Ahlquist, исходя из эффективности действия адреналина и норадреналина на различные ткани, разделял АР на 2 класса: α-адренергические, на которые норадралин действует эффективнее, чем адреналин, и β-адренергические, эффективнее взаимодействующие с адреналином [1]. Позднее, более тщательный фармакологический анализ позволил разделить основные типы АР, по меньшей мере, на 2 подтипа: α₁/α₂ [2] и β₁/β₂ [3]. Некоторые лиганды обладают выраженной селективностью в отношении α₁- или α₂-рецепторов. Например, сродство у α₁-рецепторов к празозину в 1000—10 000 раз выше, чем у α₂-рецепторов [4], а йохимбин гораздо эффективнее блокирует локализованные в основном пресинаптически α₁-рецепторы, чем постсинаптические α₂-рецепторы [5]. Подтипы адренорецепторов β₁ и β₂ различаются по характеру сродства к агонистам в ряду: изопротеренол > норадралин = адреналин (для β₁-АР) и изопротеренол > адреналин > норадралин (для β₂-АР) [3].

АР относятся к обширному семейству рецепторных молекул, которые передают в клетку сигнал о взаимодействии с ними агониста через GTP-связывающие белки (G-белки). Процесс трансмембранной передачи сигнала в этом случае имеет характерный сценарий, первым этапом которого является связывание агониста со специфическим рецептором, находящимся в плазматической мембране клетки. Активированный агонистом рецептор взаимодействует с соответствующим G-белком и вызывает на нем обмен GDP на GTP в нуклеотидсвязы-

вающем центре, GTP-связанная форма G-белка диссоциирует из комплекса с рецептором и активирует эффекторный белок, модулируя тем самым внутриклеточный уровень «вторичного послания» [6].

Различные подтипы AP передают в клетки разные сигналы. Так, β_1 - и β_2 -AP взаимодействуют с G_s -белком, который передает активирующий сигнал на аденилатциклазу. α_2 -AP ингибирует аденилатциклазу через другой GTP-связывающий G-белок (G_i). α_2 -AP может также стимулировать Na^+/H^+ -канал [7], однако G-белок, участвующий в этом процессе, точно неизвестен. α_1 -AP активирует фосфолипазу C через пока еще плохо охарактеризованный G-белок и, в конечном итоге, обеспечивает кальциевую регуляцию внутриклеточных процессов [8].

Таким образом, AP, как и любые другие рецепторные молекулы, выполняют 2 основные функции: дискриминирующую и транслирующую. Подтипы AP способны различать как лиганды—адреналин и норадреналин, так и G-белки. При взаимодействии с агонистом они транслируют сигнал об этом на G-белок. Сигнал передается и в обратную сторону: при связывании GTP с G-белком, находящимся в комплексе с рецептором, сродство последнего к агонисту снижается [9]. Известны и другие механизмы регуляции активности рецепторов, главным из которых является десенситизация, то есть потеря чувствительности рецептора к взаимодействующему с ним агонисту.

Все эти функции детерминированы в структуре рецепторов. В последнее время, благодаря успехам в клонировании генов многочисленных сопряженных с G-белками рецепторов (а таких молекул насчитывается в настоящее время более 50), удалось выявить общие черты и отличия в их строении. Конструирование мутантных и химерных генов рецепторов, их экспрессия в культивируемых животных клетках позволила локализовать отдельные участки молекул AP, отвечающие за выполнение ими перечисленных выше функций.

Топография адренергических рецепторов

Первичная последовательность β_2 -AP была определена в 1986 г. на основе расшифрованной в лаборатории Р. Лефковича структуры гена этого рецептора, выделенного из геномного банка хомяка [10]. При анализе профиля гидрофильности-гидрофобности молекулы было предсказано, что полипептидная цепь рецептора имеет 7 участков длиной 20—25 аминокислотных остатков, которые, вероятно, образуют трансмембранные α -спирали. Предполагаемые трансмембранные домены разделяются 8-ью гидрофильными последовательностями к которым относятся локализованные по разные стороны мембраны N-концевой и C-концевой фрагменты, а также 6 петель, 3 из которых расположены по одну, а 3—по другую сторону мембраны. Модель укладки β_2 -AP в мембране оказалась аналогичной модели укладки бактериородопсина [11], а также зрительного родопсина [12]. Более

того, выявилась значительная гомология между молекулами β_2 -АР и родопсина, а также наличие β_2 -АР консенсусной для гликозилирования последовательности вблизи от N-конца молекулы. На основании всех этих данных было высказано предположение, что N-конец β_2 -АР экспонирован на внеклеточной стороне мембраны, а С-конец обращен в цитоплазму. Схема организации β_2 -АР в мембране представлена на рисунке.

Позднее были получены экспериментальные доказательства такой модели укладки β_2 -АР. Dohlman и соавт. [13], используя ограниченный протеолиз β_2 -АР из легких хомяка, находящегося в искусст-

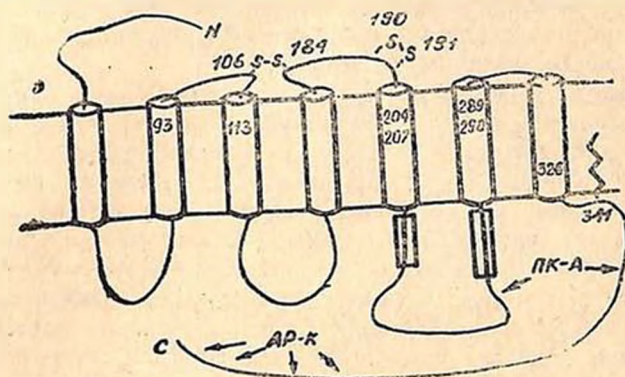


Рис. Схема организации β_2 -адренергического рецептора человека. Цифрами отмечены аминокислотные остатки, участвующие в связывании лиганда. Участки третьей цитоплазматической петли, ответственные за взаимодействие с G-белком заключены в прямоугольники. PK-A—протеникиназа А, AP-K—киназа β -адренергического рецептора. Стрелками указаны места локализации фосфорилируемых остатков. 341—пальмитилируемый остаток Cys-341

венной и естественной мембранах, подтвердили, что β_2 -АР имеет характерную «родопсиноподобную» структуру, включая расположение пронизывающих мембрану районов, а также области гликозилирования на внеклеточном N-концевом домене. Как известно, β_2 -АР являются субстратами различных протеникиназ, и фосфорилирование рецепторов играет важную роль в их функционировании (см. ниже). Было показано, что фосфопептиды β_2 -АР локализованы также на участках рецептора, обращенных в цитоплазму [13]. Предсказанная укладка β_2 -АР в мембранах была независимо подтверждена и с использованием специфических кроличьих антител к II синтетическим пептидам для каждой из гидрофильных последовательностей β_2 -АР хомяка [14].

Доступность нуклеотидной последовательности к ДНК β_2 -АР хомяка открыла широкие возможности для молекулярного клонирования других адренорецепторов. За 1—2 года были определены первичные структуры α_1 -АР, α_2 -АР, β_1 -АР и β_2 -АР из других объектов

[15—17], M_1 — M_4 -мускариновых холинэргических рецепторов [18—21], серотониновых рецепторов 5-HT—1a и 5-HT—1c [22, 23], рецептора субстанции К [24], продукта гена mas, который, как выяснилось позднее, является ангиотензиновым рецептором [25, 26].

Стало очевидным, что β_2 -АР являются членами большого семейства рецепторных белков, осуществляющих свои функции через G-белки [27]. Эксперименты по перекрестной гибридизации с уже клонированными генами рецепторов или их фрагментами во многих случаях выявляют существование неизвестных ранее подтипов рецепторов. Например, обнаружены по крайней мере 4 новых подтипа мускариновых рецепторов и 3 подтипа α_2 -АР, трудно отличимых фармакологически от известных белков [21, 28].

Как уже отмечалось ранее, аминокислотные последовательности β_2 -АР и родосина имеют значительные области гомологии. Однако примеры консерватизма отдельных участков структуры характерны для всего семейства белков, сопряженных с G-белками. При сравнении аминокислотных последовательностей различных рецепторов выяснилось, что при среднем уровне гомологии 45—50% сходство первичных структур мембранных участков у адренергических и родосиновых рецепторов достигает 70—85%. Из гидрофильных петель наиболее консервативны первая и вторая цитоплазматические петли. Внеклеточные домены, третья цитоплазматическая петля и С-концевая область являются наиболее вариабельными участками рецепторов [29].

Интересные корреляции обнаружены между размерами третьей цитоплазматической петли и С-концевой области с функциями рецепторов. Все β -АР (напомним, что они взаимодействуют с G_s -белками) имеют достаточно короткую третью петлю (54—57 аминокислотных остатка) и длинную С-концевую область (84—137 аминокислотных остатка). В то же время все рецепторы, взаимодействующие с G_i -подобными белками, имеют длинную третью петлю (151—181 аминокислотных остатка) и короткую С-концевую область (21—39 аминокислотных остатка). Возможно, что эти особенности могут помочь при определении природы клонированных неизвестных рецепторов и подсказать вероятный механизм их действия [27].

Участки связывания лигандов

Лиганды АР—гидрофильные молекулы, поэтому можно было предположить, что лигандсвязывающий центр рецептора локализован во внеклеточном домене рецептора. Однако протеолитическое удаление внеклеточных участков рецептора не препятствует связыванию лигандов [30, 31]. В то же время направленные точечные мутации аминокислотных остатков в трансмембранных областях существенно влияют на лигандсвязывающие свойства рецепторов.

Адренергические лиганды содержат протопированную аминогруппу. Было логично предположить, что центр связывания лигандов рецептора должен содержать кислые аминокислотные остатки, необ-

ходимые для взаимодействия с аминокислотной группой лиганда. Действительно, было показано, что замена Asp-113 на Asp приводит практически к полной потере рецепторами способности связывать как агонисты, так и антагонисты [32]. С другой стороны, мутации по остаткам Asp-79 и Asp-318 приводят к резкому ухудшению сродства β_2 -АР к агонистам без изменения сродства к антагонистам [33]. При этом было также показано, что ни одна из этих замен не влияла на характер встраивания белка в плазматическую мембрану и на способность рецептора гликозилироваться. Замена Asp-113 на остаток Glu незначительно меняет геометрию лигандсвязывающего «кармана», однако приводит к тому, что классические антагонисты β_2 -АР, альпренолол и пропранолол, начинают частично активировать рецептор. При этом сродство мутантного рецептора к агонистам снижается на 2—4 порядка [32]. Интересно отметить, что остаток Asp-113 консервативен и у других рецепторов биогенных аминов: α -АР, мукаринных, дофаминовых и серотониновых рецепторов, но отсутствует у сходных с ними рецепторов вещества К и ангиотензина [34].

Анализируя структуры известных адренергических лигандов, Main и соавт. предположили, что в лигандсвязывающих центрах адренергических рецепторов должны присутствовать аминокислотные остатки, способные стабилизировать ароматическое кольцо катехоламинов [35]. На эту роль были выбраны несколько консервативных для сопряженных с G-белками рецепторов остатков Ser и Thr, гидроксильные группы которых могут образовывать водородные связи с гидроксильными группами катехоламинов. Было показано, что замены Ser-204 и Ser-207 в пятой трансмембранной спирали и Ser-319 в седьмой трансмембранной спирали влияют на связывание агонистов. Параметры их связывания при этом не изменяются [36]. Эффекты замены остатков Ser-204 и Ser-207 на связывание агонистов воспроизводились, если анализировали связывание с рецепторами дикого типа лигандов с удаленными гидроксильными группами в *n*- и *m*-положениях соответственно. Эти данные свидетельствуют о том, что указанные остатки Ser участвуют в образовании водородных связей с гидроксильными группами катехола. Выяснилось также, что особая роль во взаимодействии с ароматическими кольцами лигандов принадлежит остаткам гидрофобных аминокислот Phe-289, Phe-290 в шестой спирали и Tyr-326 в седьмой трансмембранной спирали. Их мутации значительно снижают способность рецепторов связывать агонисты. Кроме того, с использованием фотоактивируемого антагониста β_2 -АР *n*-(бромацетатамидо)бензил-1-[125 I]-йодокаразолола было показано, что и вторая трансмембранная спираль приближена к карману, в который погружается лиганд. При засвечивании препарата фотоактивируемый антагонист ковалентно взаимодействует с остатком His-93 β_2 -АР [13, 27].

Следовательно, для связывания лиганда существенны аминокислотные остатки, входящие во второй, третий, пятый, шестой и седьмой трансмембранные домены. Вероятно, для формирования лигандсвязыва-

вающего «кармана» они должны быть характерным образом сближены друг с другом. Однако для связывания лигандов необходимы не только аминокислотные остатки, локализованные в трансмембранных сегментах рецептора. При замене одного из двух рядом расположенных во второй внеклеточной петле остатка Cys-190 и Cys-191 на остаток Ser резко снижается сродство β_2 -АР к агонистам и антагонистам, а при замене обоих остатков β_2 -АР теряет способность связывать лиганд [37]. Недавно с использованием другого подхода эти данные были не только подтверждены, но и дополнены. Оказалось, что дитиотреитол выступает в роли «конкурентного» ингибитора связывания агонистов с β_2 -АР [38]. Это может свидетельствовать о том, что дисульфидные связи принимают участие в формировании связывающего центра рецептора. Поскольку эффект дитиотреитола носил двухфазный характер, сделан вывод, что для связывания лиганда требуется целостность двух дисульфидных связей. Помимо S-S-мостика между Cys-190 и Cys-191 в β_2 -АР имеется дисульфидный мостик между Cys-106 (С-конец первой внеклеточной петли) и Cys-184 (середина второй внеклеточной петли) [39]. Интересно отметить, что все эти остатки Cys высоко консервативны у очень многих сопряженных с G-белками рецепторов.

Как уже отмечалось, фармакологические различия между β_1 -АР и β_2 -АР сводятся к тому, что β_2 -АР более эффективно взаимодействует с адреналином, чем с норадреналином. При фармакологическом анализе химерных рецепторов, у которых часть полипептидной цепи отвечала структуре β_1 -АР, а часть — β_2 -АР, было установлено, что химерная молекула, в которой β_1 -АР принадлежали только трансмембранные спирали 4 и 5, обладала специфичностью β_1 -АР. Менее существенные замены трансмембранных спиральных участков и отдельные аминокислотные замены у β_2 -АР не меняли его фармакологической специфичности [39], из чего можно заключить, что фармакологическая специфичность β -АР определяется не отдельными аминокислотными остатками, а общей конформацией рецептора, на которую влияют аминокислотные последовательности, входящие в состав 4- и 5-й трансмембранных спиралей.

Участки взаимодействия с G-белками

Поскольку G-белки не являются интегральными трансмембранными белками и относительно гидрофильны [6], с ними, вероятнее всего, контактируют обращенные в цитоплазму участки рецепторов. Из экспериментов по реконструкции очищенных рецепторов с G-белками, известно, что многие, если не все рецепторы, способны взаимодействовать не с одним, а с несколькими видами G-белков, хотя и с разной эффективностью [40, 41]. Очевидно, специфичность взаимодействия определяется не консервативными участками цитоплазматических областей структуры рецепторов, как, впрочем и других ре-

цепей этого семейства, являются первые две цитоплазматические петли, а наиболее вариабельна третья цитоплазматическая петля.

Действительно, Dixon и соавт. путем создания делеций в третьей цитоплазматической петле β_2 -АР хомяка обнаружили, что мутантные β_2 -АР с делециями остатков 222—229 и 258—270 не способны активировать аденилатциклазу [31, 42], то есть взаимодействовать с G_s -белками. Интересно, то мутант с делецией фрагмента 230—257 не теряет своей активности.

Такие же выводы были сделаны на основании экспериментов с химерными АР, часть полипептидной цепи которых принадлежала взаимодействующему с G_s -белком β_2 -АР, а часть—взаимодействующему с G_i -белком α_2 -АР [43]. Химера, у которой третья цитоплазматическая петля и шестой трансмембранный домен принадлежали β_2 -АР, а остальная структура— α_2 -АР, связывала агонисты α_2 -АР, но активировала аденилатциклазу, то есть взаимодействовала не с G_i , а с G_s -белком. Если третья цитоплазматическая петля играет важную роль в обеспечении специфичности, то прочность связывания, как было показано O' Doud и соавт., определяется второй цитоплазматической петлей и консервативным остатком Cys-341 [44]. Позже выяснилось, что Cys-341 молекулы β_2 -АР модифицирован остатком пальмитиновой кислоты, который дополнительно закрепляет С-концевой домен рецептора в мембране. Направленная замена Cys-341 на остаток Gly или Ala нарушает способность рецептора активировать аденилатциклазу [45].

Подробности молекулярного механизма активации рецептором G-белка остаются пока неясными. Появление новых подходов к решению этой проблемы вызвало открытие уникального действия на клетки мастопарапа 14-членного пептида из яда осы, который способен, подобно рецепторам, активировать некоторые G-белки. При этом гомологи мастопарапа с известными рецепторами обнаружено не было [46, 47]. Было показано, что мастопарап особенно эффективно взаимодействует с G-белками, встроенными в фосфолипидные везикулы. Он не только увеличивает связывание G-белком негидролизуемого аналога GTP, гуанозин-5-(γ -тио) трифосфата, гидролиз GTP, ускоряет GTP-GDP обмен, но и препятствует ADP-рибозилированию G-белка коклюшным токсином [48]. На поверхности раздела липид-вода мастопарап сворачивается в амфипатическую спираль. Интересно, что N- и С-концевые участки третьей цитоплазматической петли адренорецепторов, согласно расчетам, также имеют α -спиральную структуру с аналогичным (но не идентичным) расположением заряженных аминокислотных остатков [39].

Способность мастопарапа стимулировать G-белки показывает, во-первых, что центр, участвующий в активации G-белка, может быть ограничен участком, состоящим из 15—20 аминокислотных остатков, и, во-вторых, что в принципе для активации G-белка важна определенная пространственная конформация, а аминокислотный состав при этом является вторичным фактором и может значительно варьиро-

вать. Однако совсем недавно было показано, что точечные консервативные замены в одном из этих важных для активации G-белка участков рецептора оказывают существенное влияние на эффективность стимуляции рецептором G-белка. Так, консервативные замены Ala-293 на Leu и Lys-290 на His в С-концевом фрагменте 3-й цитоплазматической петли α_1 -АР приводит к увеличению потентности норадреналина в стимуляции фосфолипазы С на 2 порядка [48]. Дополнительные сведения о роли этого участка во взаимодействии G-белка с рецепторами были получены при изучении свойств мутанта β_2 -АР с deletion в нем 7 аминокислотных остатков (267—273) [49]. Этот мутантный рецептор значительно слабее активировал аденилатциклазу, чем нативный, но не отличался от нативного по прочности взаимодействия с G-белком. Это выражалось в способности рецептора образовывать высокоаффинный тройной комплекс агонист-рецептор-G-белок. Следовательно, для физического сопряжения рецептора с G-белком и для его активации рецептором требуются различные молекулярные детерминанты рецептора.

Регуляция активности адренергических рецепторов

Адренергические рецепторы, служащие регуляторами клеточной активности, сами подвергаются регуляции со стороны клетки. Система трансмембранной передачи сигнала является каталитической с громадным коэффициентом усиления. В роли катализатора выступают все ее компоненты; при взаимодействии одной молекулы гормона с молекулой рецептора последний способен активировать до 20 молекул G-белков, каждая α -субъединица G-белка способна существенно увеличить активность аденилатциклазы, которая активно продуцирует сАМР до тех пор, пока GTP не будет гидролизован α -субъединицей до GDP [6]. В некоторых клетках уровень сАМР после нескольких секунд воздействия гормона возрастает до 400 раз по сравнению с исходным [50]. Клетка не может в течение длительного времени выдержать такого «давления» регуляторного сигнала, и в процессе эволюции появилось несколько механизмов, позволяющих ей отключаться от воздействия внешнего биорегулятора. Потеря клеткой способности реагировать на гормональные сигналы называется «десенситизацией» или «десенсibilизацией» [51].

Различают две формы десенсibilизации: гомологичную и гетерологичную. Гомологичная, или агонист-специфичная, десенсibilизация проявляется в уменьшении клеточного ответа только на десенсibilизирующий гормон, тогда как другие гормоны сохраняют способность действовать на клетку [52]. При гетерологичной, или агонист-неспецифичной, десенсibilизации клетка теряет чувствительность к целому ряду агонистов, взаимодействующих с разными рецепторами [53]. У многих клеток процесс десенсibilизации является двухэтапным. Например, через 5—30 мин после начала инкубации клеток астроциты с изопротеренолом чувствительность аденилатциклазы к агонистам β_2 -АР в их мембранах снижается на 50—60%. Количество ре-

цепторов на поверхности клетки при этом не меняется. Этот этап обратим: через 20 мин после удаления агониста из среды все свойства аденилатциклазной системы восстанавливаются. После 2—6 ч инкубации клеток с изопротеренолом содержание рецепторов на клеточной мембране снижается на 80%, и в такой же степени падает чувствительность аденилатциклазы к стимуляции. В этом случае свойства аденилатциклазной системы восстанавливаются лишь в результате синтеза и включения в мембрану новых молекул рецепторов [54].

Одной из основных молекулярных мишеней десенситизации являются рецепторы гормонов и нейромедиаторов. Рецепторы, выделенные из десенситизированных клеток, при реконструкции с G-белками не активировали их при добавлении агониста [55]. Было обнаружено, что эти рецепторы, в отличие от нативных, обладающих биологической активностью, фосфорилированы. AP являются субстратами различных протеникиназ. В серии работ, выполненных в лаборатории Р. Лефковича, было убедительно показано, что основной причиной гетерологичной десенситизации β_2 -AP является их фосфорилирование сАМР-зависимой протеникиназой (протеникиназой А) [56—58]. Эти результаты были получены, в основном, на клетках эритроцитов птиц. При активации аденилатциклазы в этих клетках различными гормонами или негормональным путем—за счет действия на клетки форсколина или проникающих аналогов сАМР происходило фосфорилирование их β -AP по остаткам серина и треонина (2—3 моля фосфата на 1 моль рецептора), и рецепторы теряли способность взаимодействовать с G-белками.

Участки фосфорилирования β_2 -AP протеникиназой А локализованы в С-концевой области 3-й цитоплазматической петли и в проксимальной части С-концевого «хвоста» рецептора, где содержатся консенсусные последовательности для фосфорилирования протеникиназой А: Arg-Arg-Ser-Ser [59]. Как было указано выше, оба места атаки протеникиназой А локализованы вблизи места взаимодействия β_2 -AP с G_s-белком. Мутантный β_2 -AP, у которых в консенсусном участке остатки Ser были заменены на Ala, не фосфорилировались при увеличении в клетках уровня сАМР и десенситизировались медленнее и менее полно, чем нативный [60]. Однако эти мутации не препятствовали быстрой интернализации β_2 -AP.

Протеникиназа С также фосфорилирует β_2 -AP *in vitro*, хотя и в меньшей степени, чем протеникиназа А [61]. Обработка intactных клеток форболовыми эфирами, которые активируют протеникиназу С, вызывает фосфорилирование и десенситизацию β_2 -AP [62, 63]. Это свидетельствует о том, что протеникиназа С, которая активируется в клетке диацилглицерином и Ca^{2+} , также может участвовать в фосфорилировании и гетерологичной десенситизации β_2 -AP.

Гомологичная десенситизация β_2 -AP также связана с их фосфорилированием [64]. Однако этот процесс катализируется не протеникиназой А. В частности, в мутантных линиях клеток лимфомы S49 штамма сус⁻, дефектных по G-белку, или штамма kin⁻, дефект-

ном по протеникиназе А, агонист индуцирует фосфорилирование рецептора [65]. Это свидетельствовало о присутствии в клетках особой формы протеникиназы, фосфорилирующей β_2 -АР. Такой фермент, названный киназой β -АР (β -АРК), был выделен из клеток S49 kip⁻ [66]. Он фосфорилирует только оккупированный агонистом рецептор. Свободный от лигандов β_2 -АР или рецептор, связавший антагонист, не являются субстратами β -АРК. β -АРК в отличие от других известных киназ, таких как cAMP-, cGMP-, Ca^{2+} -кальмодулин- и Ca^{2+} -фосфолипидзависимых протеникиназ, не фосфорилирует такие «классические» субстраты киназ, как казеин и гистоны. В нестимулированных клетках β -АРК локализована в цитоплазме, но транслоцируется к занятому агонистом рецептору и фосфорилирует его [67]. Оккупированные агонистами мускариновые холинэргические рецепторы и α_2 -АР также являются субстратами β -АРК [68, 69]. Для действия β -АРК не требуется присутствия G_s -белка [70].

Многочисленные данные свидетельствуют, что остатки Ser и Thr, по которым β -АРК фосфорилирует β -АР, локализованы в богатых этими остатками С-конце β -АР. Так, удаление предполагаемых участков фосфорилирования β_2 -АР в С-концевой области с помощью направленного мутагенеза в значительной степени снижает эффект гомологичной десенситизации [70]. С другой стороны, если β -АР реконструировать в фосфолипидные пузырьки, а затем фосфорилировать β -АРК в присутствии агониста, то карбоксипептидаза А, последовательно отщепляющая аминокислоты с С-конца молекулы, постепенно снижает содержание в рецепторе радиоактивного фосфата [71].

Однако оказалось, что лишь фосфорилирование β -АР специфичной киназой недостаточно для утраты им способности передавать сигнал на G_s -белок [72], а необходим еще и растворимый белок, взаимодействующий с фосфорилированным β -АРК рецептором. Ген этого белка был выделен из библиотеки кДНК мозга быка и секвенирован [73]. Белок, кодируемый этим геном, на 59% гомологичен аррестину из сетчатки, который выполняет аналогичную функцию (ранее было показано, что зрительный родопсин десенситизируется в результате фосфорилирования родопсин-киназой и последующего связывания с ним белка аррестина [74], а аррестин способен, хотя и с низким родством, взаимодействовать с фосфорилированным β -АРК β -адренергическим рецептором и препятствовать его взаимодействию с G_s -белком [72]). Более того, клонированный белок, названный β -аррестином, имеет участки гомологии с α -субъединицами G_s , G_o и G_{12} -белков.

Недавно Lohse и соавт. удалось оценить вклад всех трех механизмов десенситизации β -АР в клетках эпидермоидной карциномы A431—гетерологичной десенситизации, индуцируемой протеникиназой А, гомологичной десенситизации, индуцируемой β -АРК и интернализации β -АР с клеточной поверхностью—в суммарный процесс потери клетками чувствительности к агонистам [75]. Они использовали специфические ингибиторы обеих протеникиназ. Было показано, что

ингибирование каждой из протеинкиназ снижает степень десенситизации на 40—50%, а интернализация рецепторов обеспечивает 20—30% десенситизации. Изопротеренол в диапазоне наномольных концентраций активировал только обеспечиваемый протеинкиназой А механизм десенситизации. Десенситизация, связанная с фосфорилированием рецепторов β -АРК, проявлялась только при микромолярной концентрации агониста. Было высказано предположение, что десенситизация по механизму, связанному с протеинкиназой А, затрагивает *in vivo* периферические рецепторы, реагирующие на наномолярные концентрации адреналина, а десенситизация рецепторов β -АРК имеет место в синапсах, где концентрация катехоламинов может достигать высоких величин [76].

Судьба фосфорилированного рецептора в клетке может быть различна. В любом случае в фосфорилированном виде рецептор «исчезает» с клеточной поверхности (интернализуется), попадая в замкнутые внутриклеточные пузырьки. В дальнейшем он может либо подвергнуться дефосфорилированию, и, рано или поздно, рециркулировать в плазматическую мембрану [77], либо окончательно деградировать [78, 79]. Этот процесс называется «отрицательная регуляция».

Сведения о наличии у β_2 -АР какой-либо другой активности, помимо способности передавать сигнал на аденилатциклазу, в настоящее время отсутствуют. Однако нельзя исключить, что они проявляют и другие виды биологической активности. Например, общепринято, что рецепторы фактора роста эпидермиса передают сигнал в клетку за счет того, что являются тирозинкиназами [80]. Но появились данные, что они обладают и нуклеазной активностью [81].

Нами было обнаружено интересное свойство β_2 -АР мозжечка быка—их чувствительность к специфическим ингибиторам сериновых протеаз—дипропионилфторфосфату (ДФФ) и фенилметансульфонилфториду, модифицирующим остаток серина, и N- α -тозил-L-лизинхлорметилкетону, модифицирующему остаток гистидина в активном центре протеаз [82]. Ингибиторы снижали связывание как агониста, так и антагониста β_2 -АР в мембранах мозжечка и в мембранах эритроцитов лягушки, а также очищенного β_2 -АР, реконструированного в липосомы. Ингибиторы в большей мере снижали сродство рецепторов для агонистов, чем для антагонистов. Поскольку ингибиторы протеаз не действовали на β_2 -АР в intactных эритроцитах лягушки, сделан вывод, что модифицируемый участок локализован в цитоплазматическом домене β_2 -АР. Кроме того, было обнаружено, что [3 H]ДФФ стехиометрически включается в очищенный β_2 -АР, причем агонист полностью, а антагонист лишь частично блокирует меченое рецепторов ингибитором протеазы.

При сравнении первичных структур β_2 -АР и химотрипсина было обнаружено три гомологичных участка, два из которых прилегают к остаткам Asp-102 и His-57, а третий включает в себя активный Ser-195 химотрипсина, гомологичный Ser-401 β_2 -АР. Известно, что Asp-102, His-57 и Ser-195 химотрипсина формируют его активный

протеолитический центр. В молекуле химотрипсина ДФФ ковалентно включается в остаток Ser-195 благодаря особым свойствам этого остатка. Относительно протяженные гомологичные участки локализованы во второй цитоплазматической петле β_2 -АР и в его С-концевой части, причем Ser-401 находится в районе, фосфорилируемом β_2 -АРК. Роль особого остатка Ser в молекуле β_2 -АР остается неясной, однако нельзя исключить, что он входит в состав центра, выполняющего неизвестную пока ферментативную функцию.

Таким образом, расшифровка первичной структуры АР не только существенно облегчила понимание механизмов преобразования ими химических сигналов, но и позволила поставить вопрос о том, не выполняет ли эта молекулярная машина и другие, ранее неизвестные функции.

STRUCTURE AND FUNCTION OF β -ADRENERGIC RECEPTORS

VOYEIKOV V. I.

M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow

The modern ideas about β -adrenergic receptors structure are considered in the review. The role of separate amino acid residues and the sites of primary sequences of these proteins in their functioning, i. e. the ability to bind ligands specifically and transmit the signal about the interaction with agonist on the coupled G-protein are discussed. The data about the molecular mechanisms receptors desensitization are brought.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahlquist R. P. Amer. J. Physiol., v. 153, p. 586—600, 1948.
2. Lands A. M., Groblewski G. E., Brown Jr. T. G. Arch. Int. Pharmacodynamic Therap., v. 151, p. 68—75, 1966.
3. Langer S. Z. Biochem. Pharmacol., v. 23, p. 1793—1800, 1965.
4. U'Prichard D. C., Eylund D. B., Snyder S. H. J. Biol. Chem., v. 253, p. 5093—5102, 1978.
5. Starke K., Borowski E., Endo T. Eur. J. Biochem., v. 34, p. 359—388, 1975.
6. Gilman A. G. Ann. Rev. Biochem., v. 56, p. 615—621, 1987.
7. Isom L. I., Cragoe E. G., Limbird L. E. J. Biol. Chem., v. 262, p. 6750—6757, 1987.
8. Berridge M. J., Irvine R. Nature, v. 312, p. 315—321, 1984.
9. Воейков В. И. Итоги науки и техники. Серия «Биоорганическая химия». Москва, ВИНТИ, т. 2, с. 49—53, 1984.
10. Dixon R. A. F., Kobitka B. K., Strader B. J., Benovic J. L., Dohman H. G., Friel T., Bolanowski M. A., Benet C. D., Fagan E., Dech R. E., Mumford R. A., Sailer E. E., Sigal I. S., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Strader C. D. Nature, v. 321, p. 75—79, 1986.
11. Henderson R., Unwin P. N. Nature, v. 257, p. 28—32, 1975.
12. Ouchinnikov Yu. A. FEBS Lett., v. 148, p. 179—191, 1982.
13. Dohman H. G., Bouvier M., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J. J. Biol. Chem., v. 262, p. 14232—14288, 1987.
14. Hsien-yu Wang, Lipfert L., Meibon C. C., Bachouh S. J. Biol. Chem., v. 264, p. 14424—14431, 1989.

15. Colecchia S., Schwinn E. A., Randail R. R., Lefkowitz R. J., Caron M. G., Kobilka B. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 7159—7163, 1988.
16. Fricelle T., Collins S., Daniel K. W., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Kobilka B. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 7920—7924, 1987.
17. Kobilka B. K., Bolanowski M. A., Caron M. G., Dixon R. A. F., Dohman H. G., Francke U., Lefkowitz R. J., Sigal I. S., Yangteng T. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 46—50, 1987.
18. Kubo T., Maeda A., Sugimoto K., Akiba I., Mikami A., Takahashi H., Haga K., Haga T., Ichiyama A., Kangawa K., Matsuo H., Hirose T., Numa S. *FEBS Lett.*, v. 229, p. 367—370, 1976.
19. Ashkenazi A., Winslow J. W., Pralle E. G., Peterson G. L., Schimerlik M. I., Capon D. J., Ramachandran J. *Science*, v. 238, p. 672—675, 1987.
20. Kubo T., Fukuda K., Mikami A., Maeda A., Takahashi H., Mishina M., Haga K., Haga T., Ichiyama A., Kangawa K., Kojima M., Matsuo H., Hirose T., Numa S. *Nature*, v. 323, p. 411—416, 1990.
21. Pralle E. G., Ashkenazi A., Winslow J. W., Smith D. H., Ramachandran J., Capon D. J. *EMBO J.*, v. 6, p. 3023—3029, 1987.
22. Fargnoli A., Raymond J. P., Lohse M. J., Kobilka B. K., Caron M. G., Lefkowitz R. J. *Nature*, v. 335, p. 358—360, 1988.
23. Julius D., MacDermott A. B., Axel R., Jessel T. M. *Science*, v. 241, p. 558—564, 1988.
24. Masu Y., Nakayama K., Tamaki H., Harada Y., Kuno M., Nakanishi S. *Nature*, v. 229, p. 835—838, 1987.
25. Young D., Waite G., Birchmeier C., Fasano O., Wigler M. *Cell*, v. 45, p. 711—719, 1986.
26. Jackson T. R., Blair L. A. C., Marshall J., Goedert M., Hanley M. R. *Nature*, v. 335, p. 437—440, 1988.
27. Lefkowitz R. J., Caron M. G. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 4993—4996, 1988.
28. Fagan J. W., Kobilka B. K., Yang-Feng T. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Kobilka B. K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 85, p. 6301—6305, 1988.
29. O'Dowd P. F., Lefkowitz R. J., Caron M. G. *Ann. Rev. Neurosci.*, v. 12, p. 67—83, 1989.
30. Rubinstein R. C., Wang S. K. F., Ross E. M. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 16555—16562, 1987.
31. Dixon R. A. F., Sigal I. S., Rands E., Register R. B., Blake A. D., Strader C. D. *Nature*, v. 325, p. 73—77, 1987.
32. Strader C. D., Candore M. R., Hill W. S., Dixon R. A. F., Sigal I. S., J. *Biol. Chem.*, v. 264, p. 16470—16477, 1989.
33. Strader C. D., Sigal I. S., Register R. B., Candore M. R., Rands E., Dixon R. A. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 84, p. 4354—4358, 1987.
34. Strader C. D., Sigal I. S., Candore M. R., Rands E., Hill W. S., Dixon R. A. F. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 10267—10271, 1988.
35. Main B. G., Tucker H. *Progr. Med. Chem.*, v. 22, p. 122—143, 1985.
36. Strader C. D., Candore M. R., Hill W. S., Sigal I. S., Dixon R. A. F. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 13572—13578, 1989.
37. Fraser C. M. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 9266—9270, 1989.
38. Dohman H. G., Caron M. G., Deobani A., Fricelle T., Lefkowitz R. J. *Biochemistry*, v. 29, p. 2335—2342, 1990.
39. Strader C. D., Sigal I. S., Dixon R. A. F., FASEB J., v. 3, p. 1825—1832, 1989.
40. Carone R. A., Stanislawski G., Benovic J. L., Lefkowitz R. J., Caron M. G., Giershik P., Somers R. L., Spiegel A. M., Codina J., Birnbaumer L. *J. Biol. Chem.*, v. 260, p. 1493—1498, 1985.
41. Carone R. A., Regan J. W., Adams H., Codina J., Benovic J. L., Giershik P., Somers R. L., Spiegel A., Birnbaumer L., Lefkowitz R. J., Caron M. G. *J. Biol. Chem.*, v. 261, p. 1001—1006, 1986.

42. *Sirader C. D., Dixon R. A. F., Chkung A. H., Candelore M. R., Blake A. D., Sigal I. S.* J. Biol. Chem., v. 262, p. 16139-16143, 1987.
43. *Kobilka B. K., Caron M. G., Daniel K. W., Kobilka T. S., Lefkowitz R. J., Regan J. W.* Science, v. 240, p. 1310-1316, 1988.
44. *O'Dowd B. F., Hnatowich M., Regan J. W., Leader W. M., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 263, p. 15985-15992, 1988.
45. *O'Dowd B. F., Hnatowich M., Caron M. G., Lefkowitz R. J., Bouvier M.* J. Biol. Chem., v. 264, p. 7594-7599, 1989.
46. *Nakuhata N., Abe M. T., Matsuoka I., Nakanishi H.* FEBS Lett., v. 260, p. 95-97, 1990.
47. *Higashijima T., Uzu S., Nakajima T., Ross E. J.* J. Biol. Chem., v. 263, p. 6491-6494, 1988.
48. *Cotecchia S., Exum S., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 87, p. 2896-2900, 1990.
49. *Hausdorff W. P., Hnatowich M., O'Dowd B. F., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 265, p. 1338-1393, 1990.
50. *Johnson G. L., Wolfe B. B., Harden T. K., Motinoff P. B., Perkins J. P.* J. Biol. Chem., v. 253, p. 1472-1480, 1978.
51. *Butcher R. W., Ho R.-J., Meng H. C., Sutherland E. W.* J. Biol. Chem., v. 240, 4515-4523, 1965.
52. *Kakuichi S., Rall T. W.* Mol. Pharmacol., v. 4, p. 367-378, 1968.
53. *Ho R.-J., Sutherland E. W.* J. Biol. Chem., v. 246, p. 6522-6527, 1971.
54. *Su Y.-F., Harden T. K., Perkins J. P.* J. Biol. Chem., v. 255, p. 7110-7119, 1980.
55. *Strulovici B., Cerione R. A., Kilpatrick B. F., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Science, v. 225, p. 837-840, 1984.
56. *Stadel J. M., Rebar R., Shorr R. G. L., Sawyer D. F., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Biochemistry, v. 25, p. 3719-3724, 1986.
57. *Sibley D. R., Strasser R. H., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 259, p. 9742-9749, 1984.
58. *Nambi P., Peters J. R., Sibley D. R., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 260, p. 2155-2171, 1985.
59. *Blakeshear P. J., Nain A. C., Kuo J. F.* FASEB J., v. 2, p. 2957-2959, 1988.
60. *Hausdorff W. P., Bouvier M., O'Dowd B. F., Irons G. P., Caron M. G., Lefkowitz R. G.* J. Biol. Chem., v. 264, p. 12657-12665, 1989.
61. *Bouvier M., Leeb-Lundberg L. M. F., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 262, p. 3106-3113, 1987.
62. *Sibley D. R., Nambi P., Peters J. R., Lefkowitz R. J.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 121, p. 973-979, 1984.
63. *Kelleher D. J., Pessin J. E., Ruoho A. E., Johnson J. P.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 4316-4320, 1984.
64. *Sibley D. R., Lefkowitz R. J.* Nature, v. 317, p. 124-129, 1985.
65. *Schaeffer R. H., Sibley D. R., Lefkowitz R. J.* Biochemistry, v. 25, p. 1371-1377, 1986.
66. *Schaeffer R. H., Strasser R. H., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 2797-2801, 1986.
67. *Strasser R. H., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 9362-9366, 1986.
68. *Benovic J. L., Regan J. W., Matsui H., Mayor F. J., Cotecchia S., Leeb-Lundberg L. M. F., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* J. Biol. Chem., v. 262, p. 17251-17293, 1987.
69. *Kwira M. M., Hosey M. M., Benovic J. L., Lefkowitz R. J., Caron M. G.* Biochemistry, v. 28, p. 4543-4547, 1989.
70. *Dohmar H. G., Bouvier M., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. G.* J. Biol. Chem., v. 262, p. 14282-14288, 1987.

71. Benovic J. L., Kahn H., Weyland I., Codina J., Caron M. G., Lefkowitz R. G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 84, p. 8879—8882, 1987.
72. Lohse M. J., Benovic J. L., Codina J., Caron M. G., Lefkowitz R. G. Science, v. 249, p. 1547—1550, 1990.
73. Wilden U., Hall S. W., Kuhn H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 83, p. 1174—1178, 1986.
74. Lohse M. J., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. G. J. Biol. Chem., v. 265, p. 3202—3209, 1990.
75. Hausdorff W. P., Caron M. G., Lefkowitz R. G. FASEB J., v. 4, p. 2881—2889, 1990.
76. Yang C. D., Benovic J. L., Caron M. G., Fong Y. L., Lefkowitz R. J., Sibley D. R. J. Biol. Chem., v. 267, p. 8855—8858, 1983.
77. Sibley D. R., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J. Cell, v. 48, p. 913—922, 1987.
78. Lefkowitz R. J. Nature, v. 317, p. 124, 1985.
79. Kasuga M., Karlsson F. A., Kahn C. R. Science, v. 215, p. 185—187, 1982.
80. Kenneth T. Comments Mol. Cell. Biophys., v. 3, p. 1—13, 1985.
81. Воейков В. Л., Удовиченко И. П., Киселев О. Г., Прохорова И. А. Биол. мембраны, т. 4, с. 438—442, 1987.
82. Воейков В. Л., Гуревич В. В., Удовиченко И. П. Биол. мембраны, т. 1, с. 65—73, 1984.

Поступила 15. I. 1991

РЕЦЕНЗИИ

C. U. M. Smith *Elements of Molecular Neurobiology*. J. Wiley. Chichester, England, 1989, 525 p.

Элементы молекулярной нейробиологии

1980-е годы ознаменовались впечатляющими успехами в расшифровке молекулярных основ нейробиологии. Биологические мембраны, белки каналов, элементы цитоскелета, нейроактивные пептиды были рассмотрены с молекулярной точки зрения. Во всех молекулярных деталях изучены ионные насосы и ворота, которые ранее служили лишь объектами электрофизиологии. Деятельность синапсов теперь также признается более тонким и сложным процессом, чем это представлялось ранее. Существуют крупные подвижки в понимании процессов развития мозга и физических основ памяти. Помимо этого прослеживаются на молекулярном уровне нарушения деятельности мозга, вызывающие те или иные патологии. Прогресс в области нейронаук, в частности молекулярной нейробиологии и нейрохимии, нашел свое отражение в опубликованной в конце прошедшего десятилетия прекрасно иллюстрированного руководства «*Elements of Molecular Neurobiology*», выпущенного издательством J. Wiley (Великобритания). Автором этой книги является крупный английский ученый К. У. М. Смит, известный своими работами в области молекулярной биологии зрительных процессов. В своей книге он приводит новейшие данные, способствующие дальнейшему продвижению в понимании функции мозга в норме и патологии. Книга ставит целью ввести читателя в эту обширную и развивающуюся область нейронаук.

Автор был поставлен перед трудной задачей изложения либо устоявшихся, но устаревающих сведений, либо собственной интерпретации интереснейших фактов, где его подстерегала опасность обвинения в определенной спекулятивности выдвигаемых концепций. Каркас всего сооружения построен из элементов, в число которых вошли соответствующие разделы молекулярной биологии, биофизики и нейробиологии. Некоторые темы прослеживаются на протяжении всей книги, являясь как бы ее лейтмотивом. Биолог заметит, что интересующие его проблемы непрерывно просматриваются в эволюционной перспективе. Биофизик обратит внимание на то, что деятельность нервной системы зависит от потока ионов через мембраны, и эта тема рассматривается под разными ракурсами по всем разделам книги. Молекулярно биологический подход характеризуется изучением структуры и функции крупных и сложных молекул. В книге как раз

доминирует информация об этих структурах. Она приводится в тексте и иллюстративном материале не только для демонстрации потенциала действия и синаптической передачи, но и для объяснения архитектуры мозга, феноменов памяти и психопатологии.

Исходя из междисциплинарного характера излагаемого автором материала, он постарался изложить его в форме, доступной широкому кругу специалистов. Книга начинается с вводной главы, где читатель получает необходимые сведения об эволюции и строении нервной системы, типах нервных клеток и организации сети нейронов в мозгу. Кроме того, монография снабжена толковым словариком (гlossарий) и перечнем синонимов и сокращений. Последующие главы начинаются с рассмотрения информационных макромолекул и передачи информации в клетке на уровне ДНК и РНК. К этому же ряду примыкают главы, в которых рассматриваются молекулярная эволюция и процессинг макромолекул. В последующих разделах читателю предлагается информация о мембранах, ионных потоках, сенсорной трансдукции, нервном импульсе и биохимии синаптической передачи. Завершающие главы посвящены процессам и явлениям, описывающим высшие уровни организации биологических структур: нейроэмбриологии, проблемам обучения и памяти и нейропатологии. Здесь следует отметить особо информацию о молекулярных основах болезни Альцгеймера (старческий склероз), отражающую новейшие экспериментальные данные. Молекулярный подход позволил автору доступно изложить концепции, связывающие структуру и функции мозга. Особо следует отметить прекрасно выполненные рисунки, которые не просто иллюстрируют текст, но и позволяют в малейших деталях пространственно представить описываемые сложные явления. Здесь вспоминаются слова Леонардо да Винчи о том, что писателю зачастую не хватает слов, чтобы воссоздать совершенство, которым наделена кисть художника.

В целом рассматриваемая книга показывает плодотворность подхода к объединению на молекулярном уровне различных данных, разбросанных по отдельным субдисциплинам, в одно целое, позволяющему разносторонне освещать и решать актуальные проблемы нейробиологии.

Книга представляет несомненный интерес как для студентов и аспирантов, так и для широкого круга специалистов в области нейронаук.

Г. К. ПАРСАДАНЧИ

ХРОНИКА

АНАТОЛИЙ ТИМОФЕЕВИЧ ПИКУЛЕВ

(к 60-летию со дня рождения)

Исполнилось 60 лет со дня рождения и 35 лет научной и педагогической деятельности заслуженному работнику высшей школы, заведующему кафедрой биохимии БГУ им. В. И. Ленина, доктору биологических наук, профессору Анатолию Тимофеевичу Пикулеву.

А. Т. Пикулев родился 10 октября 1931 года в станице Глазуновской Волгоградской области. В 1955 году он окончил Волгоградский медицинский институт, а в 1958 году аспирантуру при кафедре биохимии этого же института. После защиты кандидатской диссертации А. Т. Пикулев был направлен в Кемеровский государственный медицинский институт, где работал вначале ассистентом, а затем доцентом кафедры биохимии.

С 1961 года А. Т. Пикулев—доцент кафедры физиологии и биохимии растений БГУ, а с момента открытия кафедры биохимии (1964 год) является ее бессменным заведующим. В университете Анатолий Тимофеевич начал заниматься изучением влияния относительно малых доз ионизирующей радиации на процессы азотистого метаболизма в животном организме и роли нейроэндокринной системы в механизмах опосредования ее действия. Результаты многолетних исследований обобщены в главах 3-х монографий, в статьях журналов «Вопросы медицинской химии», «Радиобиология», в зарубежных изданиях, докторской диссертации, защищенной в 1970 году.

А. Т. Пикулев постоянно уделяет внимание научной работе на кафедре. Проводимые под его руководством фундаментальные исследования в области изучения влияния экстремальных факторов на обмен веществ получили признание не только у нас в стране, но и за рубежом. Им создана научно-исследовательская лаборатория биохимии обмена веществ. А. Т. Пикулев—автор более 300 научных работ. Он много выступает с научными сообщениями на всесоюзных и международных съездах, симпозиумах, конференциях. Анатолий Тимофеевич является членом Европейского общества нейрохимиков, почетным членом Югославского общества имени Пуркинье, председателем Минского городского биохимического общества.

Успешную научную работу Анатолий Тимофеевич сочетает с плодотворной педагогической деятельностью. Глубокая эрудиция, совершенное владение методами биохимических исследований, неисся-

касная энергия привлекает к профессору А. Т. Пикулеву студентов и аспирантов, индивидуальной работе с которыми он уделяет большое внимание. Лекции Анатолия Тимофеевича проблемны, в них всегда освещаются новейшие открытия биохимии, рассматриваются возможности преодоления противоречий и трудностей на пути к биохимическому знанию. Под его руководством готовятся высококвалифицированные кадры биохимиков, защищены 32 кандидатские и 1 докторская диссертация.

А. Т. Пикулев внес существенный вклад в развитие биологического факультета, работая в должности декана с 1973 по 1980 гг. При его непосредственном участии были открыты новые специальности, научно-исследовательские лаборатории, начата строня учебная база под Минском.

Много времени А. Т. Пикулев посвящает учебно-методической и общественной работе. Он является членом научных советов АН СССР и АН БССР по радиобиологии и биохимии, членом редколлегии журналов «Вестник БГУ им. В. И. Ленина» и «Нейрохимия».

Ожывчивость, умение работать в коллективе, доброжелательное отношение к людям спускали ему заслуженный авторитет и уважение коллег, широкой научной и педагогической общности. А. Т. Пикулев награжден юбилейной медалью «За доблестный труд. В ознаменование 100-летия со дня рождения В. И. Ленина», медалью «Ветеран труда», Почетной грамотой Верховного Совета БССР, знаком Минвуза СССР «За отличные успехи в работе высшего образования СССР».

РЕДКОЛЛЕГИЯ

13-я конференция Международного общества нейрoхимии,
г. Сидней, Австралия, 15—19 июля, 1991 г.

Международное общество по нейрoхимии (МОН) представляет собой всемирную исправительственную научную организацию, объединяющую ученых, работающих в области нейронаук, на основе индивидуального членства. Существует три категории членства: действительные члены, ассоциированные члены (не пользуются правом голоса и не избираются в руководящие органы общества) и молодые ученые. Регулярно с периодичностью 1 раз в два года проводятся международные конференции общества с широкой научной программой, охватывающей по существу все основные направления нейрoхимии и связанные с ней дисциплины.

Программа 13-й Конференции МОН включала лекции, симпозиумы, коллоквиумы, семинары, сессии устных и стендовых сообщений. Основная проблематика: рецепторы и ионные каналы, нейротрансмиттеры, вторичные передатчики, межклеточная сигнализация, кальций и его роль в нейробиологии, молекулярная биология и генетика нервной ткани, патология мозга—ее молекулярные и нейрoхимические аспекты, трофические факторы в нервной системе, проблемы нейрофармакологии, новые методические подходы в исследовании функций мозга.

Рецепторы и ионные каналы, нейротрансмиттеры, трансмисмиттеры.

Эта проблема рассматривалась на нескольких симпозиумах, коллоквиумах и других сессиях. На симпозиуме «Сравнительная биохимия и фармакология лигандуправляемых ионных каналов» (руководитель—*R. Olsen*, США), были представлены доклады, в которых продемонстрированы и обобщены данные, свидетельствующие о том, что с позиций молекулярно-генетического эволюционного подхода рецепторы для ацетилхолина (никотиновый подтип, n-ACh), ГАМК, глутамата, глицина и, возможно, серотонина, могут рассматриваться как суперсемейство, имеющее общие структурные черты и происходящее от общего генетического предка. Эти рецепторы представляют собой мембранные белки, обнаруживающие общие структурные черты как у млекопитающих, так и у беспозвоночных (нааскомые, нематоды и т. д.). У нааскомых и нематод рецепторная специфичность, определяемая по способности распознавать разные фармакологические вещества/лиганды, значительно ниже, чем у позвоночных, особенно млекопитающих.

Методом молекулярного клонирования выделены ДНК, кодирующие синтез отдельных подтипов и структурных фрагментов ГАМК-А

рецептора. Это олигомерные белки, образующие хлор-ионные каналы мембран. Установлены аминокислотные последовательности, ответственные за распознавание отдельных лигандов, так называемые лигандсвязывающие участки, что принципиально важно для конструирования структуры новых фармакологически активных агонистов/антагонистов соответствующих рецепторов. Найдено, что ненасыщенные жирные кислоты, в частности олеиновая, способные модулировать связывание лигандов (мусцимола) с ГАМК-БДЗ рецепторным комплексом. Предполагается, что жирные кислоты могут играть роль эндогенных модуляторов этого рецепторного комплекса.

Большое внимание было уделено проблеме глутаматных рецепторов. На специальном colloquium «Глутаматергическая передача» с докладами выступили известные в этой области специалисты. Группа ученых из Калифорнии (С. Heinemann и др.) сообщила о клонировании семейства генов глутаматных рецепторов (Глу-Р), которые они обозначили как Глу-Р1, Глу-Р2 и т. д. до Глу-Р5. Ген Глу-Р1 кодирует рецептор, ответственный за лигандканальное взаимодействие. Изучение функциональных свойств соответствующих рецепторов показало, что у них имеются определенные различия в чувствительности к традиционным лигандам: так, если Глу-Р1 реагирует на все основные лиганды, то Глу-Р3 проявляет наибольшую чувствительность к каннату. Электрофизиологическое тестирование ответов на те или иные лиганды остается на сегодня одним из наиболее чувствительных и надежных методов изучения функциональных свойств отдельных подтипов Глу-рецепторов. D. Lodge (Великобритания) представил данные, свидетельствующие о возможности различения не-NMDA-рецепторных ответов: сульфамонилхиноксалиндион в 30 раз сильнее угнетает AMPA-вызванные ответы по сравнению с каннатиними. Обратные отношения характерны для барбитуратов метагекситона и пентабарбитала. Удобным анализатором является филантоксин—вещество полиаминовой природы, полученное из антропоид. Отдельные рецепторы, опосредующие эффекты AMPA и канната, по всей вероятности, существуют в ЦНС, однако их плотность может оказаться недостаточной для выявления физиологически значимых ответов. M. Recasens (Франция) сообщила о связи Глу-рецепторов разных подтипов с системой мембранных фосфоинозитидов. Полагают, что помимо хорошо известной синаптической функции передачи возбуждения Глу-рецепторы вовлечены в процессы образования вторичных мессенджеров диацилглицерола и инозитол-3-фосфата. Предполагается участие 4-х подтипов Глу-рецепторов в этих процессах: номотропный NMDA-рецептор (подтип 1) и 3 метаболотропных рецептора, чувствительных соответственно к квинквалату и AMPA и блокируемых ионами кадмия, но не классическими антагонистами (подтип 2); эти рецепторы имеют пресинаптическую локализацию; рецепторы, чувствительные к иботеновой кислоте, блокируемые AP-4 и AP-3 (подтип 3) и, наконец, глутаматные квинквалатные рецепторы, блокируемые дипептидом γ -Д-глутамилглицином (подтип 4). Все эти ре-

цепторы сопряжены с функцией мембранных G-белков и, по-видимому, принимают участие в обеспечении процессов синаптической пластичности. Предлагается выделять их в особую подгруппу Глу-рецепторов.

Представление о возможной функциональной роли NMDA-рецепторов значительно расширилось. Новым аспектом в изучении этих рецепторов явилось выяснение роли и участия полиаминов в Глу-синаптической передаче. Установлено, что NMDA концентрационно-зависимым способом вызывает активацию фермента *орнитиндекарбоксилазы*, основного регуляторного звена биосинтеза полиаминов. В результате наблюдается нарастание уровня путресцина, спермидина и спермина в препаратах нервной ткани, одновременно усиливается вход в клетку меченого Ca^{2+} , увеличивается высвобождение из срезов и синапсом меченых нейромедиаторов—ГАМК, Глу, норадреналина. Все эти ответы угнетаются антагонистами Глу-R—соединениями МК-801 и AP-5. Постулируется, что NMDA рецепторы функционируют как ауторецепторы на Глу-синаптических терминалях по принципу положительной обратной связи и как гетерорецепторы на нервных окончаниях нейронов иной «синаптической». Полиамины выступают в роли мессенджеров, контролирующей активность NMDA-ион-канального комплекса, транспорта кальция и процессов высвобождения нейромедиаторов из нервных окончаний в ЦНС (H. Koenig и соавт., США). Описан и детально охарактеризован участок специфического связывания меченого ифенпродила—антагониста глицинового места в составе NMDA-рецепторканального комплекса. Способность полиаминов вытеснять связанный ифенпродил позволяет рассматривать этот участок связывания как полиаминочувствительный. Большой интерес представляют данные о связи NMDA-рецепторной функции с системой арахидоновой кислоты. Последняя, как известно, накапливается в ответ на активацию NMDA-рецептора, что ведет в свою очередь к угнетению обратного захвата Глу и тем самым возрастанию его внеклеточного уровня, следствием чего может быть усиление нейротрансмиссии, с одной стороны, и увеличение риска нейротоксического действия Глу—с другой (A. Volterra и соавт., Италия). В механизме нейротоксичности агонистов Глу-рецепторов предполагается участие свободнорадикального окисления. Методом электронного спин-резонанса зарегистрировано образование свободных радикалов в мозгу монгольских песчанок «*in vivo*» в ответ на системное введение канната. Одновременно отмечается нарастание процессов перекисного окисления липидов (A. Sun и соавт., США). Высвобождение эндогенного Глу, как и вход Ca^{2+} в синапсомы, регистрируемый по красителю Fura-2, блокируются новым токсинном, выделенным из паука и предлагаемым в качестве фармакологического зонда, специфичного для особого подтипа Ca^{2+} -каналов, сопряженных с процессом высвобождения глутамата (J. Roscock и D. Nicholls, Великобритания).

Среди антагонистов Глу-рецепторов в последнее время привлекают к себе внимание блокаторы метаболотропного подтипа, в частности аминокислоты глициновая кислота (AP-3). Агонистом этого ре-

целтора является транс-(±)-1-амино-1,3-циклопентандикарбоновая кислота (ACPD), вызывающая *in vitro* стимуляцию гидролиза фосфоинозита в срезах мозга. Этот эффект как *in vitro*, так и *in vivo* устраняется AP-3. Последний может вводиться системно в дозе 250—750 мг/кг (D. Schoepp и B. Johnson, США). Предметом одного из семинаров явилось обсуждение вопроса о функциях гистамина в ЦНС и его рецепторах. В экспериментах на срезах коры крыс и мышей гистамин ведет себя как тормозный модулятор процесса пресинаптического высвобождения ряда нейромедиаторов—серотонина и норадреналина, в частности. Предполагается, что его эффект реализуется через пресинаптические гетерорецепторы, относящиеся к H₃ подтипу (M. Goethert, ФРГ). Пептид галанин, обнаруживаемый в гистаминсодержащих нейронах, проявляет ингибирующий эффект в отношении высвобождения гистамина из изолированных срезов гиппокампа и гипоталамуса, но не коры и стриатума. Эффект опосредуется, как полагают, пресинаптическими H₃-рецепторами (J. Arrang и соавт., Франция). Активация H₁-гистаминовых рецепторов вызывает накопление Ca²⁺ в культуре астроцитов, а также аккумуляцию инозитолфосфатов. С другой стороны, активация H₂-рецепторов ведет к стимуляции синтеза cAMP (N. Inagaki и соавт., Япония).

Из других нейромедиаторов большим числом сообщений (в основном частного характера в виде стендов) были представлены биогенные амины и серотонин. Одна из стендовых сессий была посвящена ацетилхолину. Молекулярно-биологическими методами охарактеризованы мускариновые АХ-рецепторы 5 подтипов: M₁, M₂...M₅. Избирательным лигандом первого подтипа АХ-Р является пирензепин, описаны новые высокоселективные лиганды для M₂-подтипа. Изменения M₂-рецепторов характерны для болезни Альцгеймера и соответствующих моделей у животных. Блокада этих рецепторов ведет к усилению релиза АХ и может оказаться терапевтически полезной для лечения этого заболевания. В университете Флиндерс (Южная Австралия) выведена линия крыс с повышенной чувствительностью холинергической системы. Предполагается, что эти животные могут служить в качестве модели депрессии (L. Daws и соавт., Австралия). Моноклональные антитела к АХ-эстеразе вызывают стойкую симпатическую дисфункцию, сопровождающуюся снижением активности ферментов АХЭ и ХАТ в симпатических ганглиях и надпочечнике.

Описан новый тип ГАМК-связывающих участков, нечувствительных ни к биккуллину, ни к баклофену, то есть не относящихся ни к одному из известных подтипов ГАМК-рецепторов (C. Drew, G. Johnsop, Австралия). Группа исследователей из Дании (Schousboe и соавт.), предложила использовать «сокультуру» астроцитов и корковых нейронов для изучения метаболизма и транспорта ГАМК. Ценные результаты могут быть получены при использовании в этом случае метода [¹³C]ЯМР. Обнаружен новый вид эндогенных модуляторов ГАМК-системы, выделенных из экстрактов мозга свиней. Это сравнительно небольшие молекулы с M_r менее 2 кД, термоустойчивые,

резистентные к кислотам и основаниям. Эти вещества угнетают биосинтез и связывание ГАМК с ее рецепторами (*J. Wu* и соавт., США, Тайвань). Группа *K. Kuriyama* (Япония) получила высокоочищенный препарат ГАМК_A-рецептора из бычьего мозга методом аффинной хроматографии, это гликопротеид с M_r 50 кД, степень очистки 2800 раз по сравнению с исходным солибализованным материалом.

Большое внимание в программе было уделено проблеме ионных каналов, особенно роли Ca^{2+} -каналов в процессах нейротрансмиссии. Становится все более очевидным, что в сопряжении с функцией Глур-рецепторов принимают участие особые каналы, поскольку эффекты Глур-агонистов, регистрируемые по входу Ca^{2+} в клетку, не блокируются стандартными антагонистами Ca^{2+} -каналов типа дигидроксипиридина. Более того, выяснилось, что в генезе нейротоксического действия NMDA* и др. агонистов Глур-рецепторов существенная роль принадлежит, по-видимому, тому Ca^{2+} , который высвобождается из внутриклеточного депо, так как нейротоксический эффект блокируется антигипертермическим агентом дитролоном. Последний предупреждает токсические эффекты NMDA и квинквалата, но не эффективен в отношении аналогичных эффектов канната и AMPA, которые не вызывают мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо (*A. Frandsen* и *A. Schousboe*, Дания). Другой механизм рецепторно-канального взаимодействия и участие в нем протеинкиназы C (PKC) продемонстрирован в работе *Y. Nomura* и соавт. (Япония). Они обнаружили модулирующее влияние PKC, проявляющееся в активации функции сопряжения NMDA-рецептор-ионный канал. Вызванный NMDA входящий ток устранялся блокатором PKC стауреспорином. Предполагается, что PKC (β -тип), фосфорилируя комплекс NMDA-R-ионный канал, вносит вклад в формирование феномена длительной потенциации, лежащей, в свою очередь, в основе кратковременной памяти.

Специальный семинар был посвящен одной из новых проблем нейробиологии, так называемой объемной нейротрансмиссии сигнала — дистантном способе передачи сигнала с одного нейрона на другой при участии межклеточной среды (отсюда термин «объемная» передача), в качестве передатчиков выступают пептиды, в частности, по-видимому, β -эндорфин. В пользу существования объемной нейротрансмиссии свидетельствует хорошо известный факт внеклеточной флуоресценции катехоламинов в мозгу, описанный более 10 лет назад группой *K. Fuxe* (Швеция).

Нейрохимическая патология мозга

Молекулярно-биологические, структурные и нейрохимические аспекты патологии мозга, возможные пути ее коррекции с позиций современной фармакологии занимали одно из центральных мест в научной программе. Специальные симпозиумы были посвящены болезни Альцгеймера (БА), нейрохимии эпилепсии, биохимическим изменениям в мозгу при шизофрении, печеночной энцефалопатии, возможностям применения ПЭТ-техники для изучения патологии ЦНС.

Роль патогенетического фактора в развитии БА принадлежит амилоиду β -А4. Отложения этого белка в виде аморфного β -амилоидного материала или кристаллических амилоидных фибрилл рассматриваются как наиболее надежный диагностический признак заболевания. β -Амилоидный белок состоит из 39-42 аминокислотных остатков и имеет своим происхождением более крупный белок, связанный с мембраной нейрона, так называемый β -APP, то есть β -амилоид белковый предшественник. β -АР представляет собой 42-членный пептидный фрагмент этого белка, встроены в мембрану с внешней ее стороны в направлении гидрофобного трансмембранного «домена». В мозгу и ликворе больных БА обнаруживаются растворимые производные β -APP, отщепляющиеся от С-конца исходной молекулы. Белковый предшественник является интегральной частью синаптической мембраны. Остается неясным, при каких условиях происходит его превращение в амилоидный фрагмент (K. Beyreuther, ФРГ; J. Pastau и соавт., США). Его образование ведет к повреждению синапса. В поисках возможных терапевтических мишеней ведется изучение ферментов, катализирующих ненормальный распад белкового прекурсора. Нейротоксическое действие β -АР, по-видимому, опосредуется через тахикинин и усиливается фактором роста нервов (НРФ). Гены семейной болезни Альцгеймера и β -APP локализованы в 21 хромосоме (R. Tanzi, США). Предполагается, что β -APP-деградирующая протеаза, содержащаяся в плазме крови больных БА, близка к калликреину. Обнаружение этого фермента откроет путь для создания его специфических ингибиторов как возможных средств лечения деменции.

На семинаре по нейрохимии эпилепсии преобладали характерные для современного уровня нейробиологических исследований молекулярные подходы. Так, каннат, введенный в гиппокамп, вызывал экспрессию одной из форм глутаматдекарбоксилазы (ГДК-67), увеличение уровня м-РНК, кодирующих одни подтипы ГАМК-рецепторов без заметных изменений других. Эти изменения протекали параллельно с нарастанием судорожной готовности животных (S. Feldblum и соавт., США). В процессе развития киндлинга тормозная функция ГАМК на гиппокампальные нейроны CA1 ослабляется уже на 4-й день, сохраняясь на этом уровне на протяжении 42 дней после последних судорог (W. Kamphuis и соавт., Нидерланды). Увеличение уровня иммунореактивности, связанной с нейропептидом Y и нейрокинином В в мишечных волокнах параллельно с аккумуляцией соответствующих м-РНК в гранулярных клетках гиппокампа отмечено после судорог, вызванных системным введением канната крысам (G. Sperk и соавт., Австрия). В этих и подобных работах интересна тенденция уловить изменения на генетическом уровне с попыткой проследить их корреляцию с развитием стойких длительных патологических процессов (повышенная судорожная готовность, киндлинг, длительная потенция и т. д.). Предложено использовать модель лимбических судорог

рог с введением хинолиновой или капповой кислот в структуры глутамата (A. Vezzani и соавт, Италия).

На семинаре по нейрохимической патологии мозга при шизофрении было представлено 3 сообщения. Детальный обзор нейрохимических находок при посмертном исследовании мозга больных шизофренией привел М. Тоги (Япония). Обнаружено увеличение плотности D_2 -рецепторов в путаменах, повышение активности тирозингидроксилазы в некоторых областях мозга (всего просмотрено более 30 структур). Найдена позитивная корреляция между изменениями активности ТГ и показателями связывания БДЗ-лиганда, а также D_2 -рецепторов. Найденны аномалии в иммунореактивности пептидов: вещества Р, мет-энкефалина, ХЦК, VIP, TRG, соматостатина, нейротензина. Формулируется синтетическая гипотеза нейрохимической этиологии шизофрении. Сообщается об увеличенном содержании Глу в лобной коре, повышенном уровне гомованилиновой кислоты, коррелирующем с показателем плотности D_2 -рецепторов в стриатуме (C. Reynolds, Великобритания). Автор известной глутаматной гипотезы шизофрении J. Kornhuber (ФРГ) сообщил о новых данных, в частности об увеличении числа мест связывания меченого МК-801, лиганда синаптического участка NMDA рецепторов, в области путамен при постмортальном изучении мозга.

Интересные данные получены при нейрохимическом изучении печеночной энцефалопатии (ПЭ). Данной теме была посвящена одна из двух лекций молодых ученых (A. Basile, США). Эта патология приобрела значительную актуальность в связи с распространением алкоголизма и злоупотребления лекарствами, что влечет за собой развитие цирроза печени. Причиной повышенного ГАМК-ергического тонуса, как показывают последние исследования, является накопление БДЗ-подобных веществ в организме. В исследованиях, выполненных совместно группами E. Costa и S. Snyder (США), выделены в мозгу больных ПЭ, животных с модельной ПЭ и грибах. Активный материал обладает свойством вытеснять меченый флуниотриазепам, один из пиков проявляет большее сродство к периферическим БДЗ-рецепторам. Вещества усиливают эффекты ГАМК на хлорный канал. Получены вещества, масс-спектры которых идентичны диазепаму и десметилдиазепаму.

Отражением существенного методического прогресса в нейрохимическом прижизненном изучении мозга явились специальные заседания, посвященные возможностям и перспективам применения ЯМР-спектроскопии, позитрон-эмиссионной томографии. Протонная ЯМР-спектроскопия позволяет одновременно определять: лактат, N-ацетил-аспартат, Глу, глутамин, креатин, фосфокреатин, холин, таурин, инозитол, глюкозу. Диагностически важные сдвиги этих показателей обнаруживаются при инсульте, рассеянном склерозе, дистрофии, опухолях мозга. Особенно ценным является постоянный неинвазивный мониторинг ряда биохимических показателей у больных, перенесших

травму мозга. Метод позволяет оценить эффективность проводимой терапии и наметить ее рациональную стратегию. Важными маркерами развивающейся дегенерации нейронов в посттравматическом периоде являются: лактат, рН, высокоэнергетические фосфаты, аминокислоты, двухвалентные катионы.

Возможности применения метода ПЭТ обсуждались на семинаре, которым руководил В. Agranoff (США). Обсуждались методики оценки регионального метаболизма мозга, состояния пре- и постсинаптических АХ-, дофаминергических маркеров и рецепторов в условиях нормы и при различной патологии мозга. Было сообщено о результатах измерения ДОФА-декарбоксилазной активности у больных: найдено значительное снижение при болезни Паркинсона и повышение в правом хвостатом ядре при шизофрении. Предложена методика оценки состояния БДЗ-рецепторов в мозгу человека с помощью меченого флумазенила. В ответ на световую стимуляцию отмечается увеличение на 20% мозгового кровотока и одновременно с этим ускорение перехода лиганда из кровотока в мозг.

Проблемы нейрофармакологии

Методологической основой современной нейропсихофармакологии является в большой степени молекулярная нейробиология. С другой стороны, успехи в изучении свойств и функции рецепторов нейромедиаторов стали возможны благодаря широкому использованию методов и принципов молекулярной фармакологии, направленному синтезу и изучению свойств высокоизбирательных специфически действующих лигандов. В качестве примера достаточно привести ситуацию, убедительно демонстрирующую принцип «множественности» рецепторов для одного и того же нейротрансмиттера: ГАМК, глутамата, норадреналина, серотонина, гистамина, ацетилхолина. Получение избирательно действующих лигандов соответствующих рецепторов является в настоящее время одним из стратегических направлений в создании новых лекарственных средств.

Частные вопросы нейрофармакологии рассматривались в связи с тем или иным конкретным рецептором, при этом следует отметить, что ни один из них, по существу не был оставлен без внимания. Наибольшее число сообщений касалось механизмов взаимодействия фармакологических веществ/лигандов с ГАМК-рецепторами, Глу-, никотин- и мускариновыми рецепторами к АХ, подтипами серотониновых и гистаминовых рецепторов. Для оценки эффектов психотропных веществ предлагается шире использовать культуру первичной ткани: показано, что низкие концентрации амтриптилина, и что особенно интересно, диазепам, способны активировать рост и развитие клеток микроглии и олигодендроглии в культуре (J. Grundt, Норвегия).

Одной из «горячих точек» обсуждения оказалась проблема функциональной роли «неортодоксальной» мессенджерной молекулы в

мозгу—окиси азота—NO. Этой теме был посвящен один из коллоквиумов. Окись азота образуется в пре- и постсинаптических структурах мозга из аминокислоты L-аргинина при участии фермента NO-синтазы, свойства и локализация которого в нервной ткани обсуждались в сообщении группы авторов из лаборатории S. Snyder (США). Аминокислотная последовательность каталитического домена напоминает структуру флавопротеинов, регуляторный домен обеспечивает фосфорилирование серина и связывание кальмодулина. Фермент активируется повышением цитозольной концентрации Ca^{2+} и функционально тесно связан с кальмодулином. Показано, что NO модулирует глутаматстимулируемый подъем уровня cGMP в мозжечке. Универсальный характер медиаторной функции NO явствует, в частности, из того, что первоначально была установлена идентичность NO релаксирующему фактору, выделенному из эндотелия. Уровень L-аргинина в мозгу контролируется, как полагают, эндальными клетками, из которых он высвобождается.

Таким образом, NO рассматривается в настоящее время как эндогенный активатор гуанилатциклазы. Ускоренное образование NO в ткани мозга возникает в ответ на стимуляцию Глут-рецепторов лигандами типа NMDA или кальция. Эндогенными ингибиторами NO-синтазы являются, как оказалось, метилпроизводные аргинина, обнаруженные в ткани бычьего мозга.

Нельзя не отметить, наконец, большой интерес, проявленный на конференции к проблеме нервной трофики, в особенности роли фактора роста нервов (ФРН). Эта проблема как бы вновь обрела актуальность благодаря фундаментальным открытиям и новым методическим подходам в этой области. Ростовой фактор фибробластов проявляет защитное действие против нейротоксического эффекта глутамата в отношении 3-дневной культуры нейронов гиппокампа (W. Seifert и соавт., ФРГ). ФРН оказывает защитное действие при перекисном повреждении клеток PC-12, воздействуя на разных этапах окислительного/антиокислительного баланса (G. Jackson и соавт., США). ФРН проявляет стимулирующие свойства в таких процессах, как нейрональное развитие, созревание, регенерация, нейрональная пластичность. В поврежденной коре мозга ФРН, введенный интрацеребрально, вызывает ремоделирование холинергических волокон и терминалей, оцениваемое по ХАТ-иммунореактивности, причем этот эффект усиливается добавлением к схеме терапии ганглиозида GM1 (A. Cuervo и соавт., Канада). Снижение содержания ФРН в мозгу старых животных, а также наблюдаемое при стрессе у молодых крыс, удается предупредить с помощью ацетил-L-карнитина (G. Taghalaoui и соавт., США). Гликопротеин нервной ткани хромогранин А также проявляет нейротрофную активность. Представлены данные о защитных свойствах фермента нейроспецифической енолазы (фактор «выживаемости» нейронов). Характерной чертой многих исследований этого направления является стремление раскрыть молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе феноменологии таких процес-

сов, как компенсация, регенерация, пластичность, то есть выяснение механизмов перестройки регуляторных влияний, действующих в макронтервалах времени.

Речь может идти о развивающейся в ответ на стимуляцию нейронов или глиальных клеток в культуре ФРН или нейротрансмиттерами типа глутамата экспрессии так называемых немедленных ранних генов (*c-fos*, *c-jun*), кодирующих транскрипционные факторы. Действие таких факторов может иметь значение при целом ряде нейрональных процессов, например, при адаптации к изменениям среды, долговременном хранении информации в ЦНС.

В научной программе были представлены и многие другие важные темы, не рассматриваемые в рамках данного обзора. Назовем лишь некоторые из них: генная экспрессия в нервной системе, передача сигнала в сетчатке, миелин, углеводный обмен в нервной ткани, липиды, ганглиозиды, мембраны, нейроиммунология, нейросекреция и т. д. Одно из заседаний было посвящено истории нейробиологии. Следует отметить, что на конференции присутствовали многие выдающиеся ученые-нейробиологи: H. Mellwain, V. Whittaker, B. Agranoff, A. Lajtha, E. Barnard, E. Costa, H. Bachelard и др.

Организацию конференции можно признать в высшей степени удачной, то же следует сказать и о научной программе.

Состоялось организационное заседание, на котором был избран новый президент МОН. Им стал известный ученый из Норвегии профессор Frode Fonnum. Следующий конгресс намечено провести летом 1993 г. в г. Монпелье (Франция). Учитывая исключительно высокую научную ценность и приоритетный характер информации, получаемой во время конгрессов МОН, следует считать целесообразным членство, по крайней мере, нескольких ученых нашей страны.

РАЕВСКИЙ К. С.

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Герштейн Л. М., Доведова Е. Л., Попова Н. С., Весков Р., Столякович М., Пекочка С., Стукалов П.</i> Нейрохимические и нейрофизиологические изменения под влиянием тафетина в условиях экспериментальной эпилепсии	113
<i>Товмасын Е. К., Антоян А. А., Кочарян М. Г., Розанов В. А., Герасимюк Г. Р., Арутюнян А. В.</i> Участие NAD в процессах синаптического возбуждения и связывания ГАМК в головном мозгу крыс	121
<i>Крмаков Н. В., Ишков А. Г., Микеров С. В.</i> Кинетические параметры чувствительности MAO типа B отделов мозга человека к дофаминергическому нейротоксину 1-метил-, 4-фенил-, 1,2,3,6-тетрагидропиридину	128
<i>Величкова А. А., Тенчева Ц. С.</i> Влияние морфина на посттрансляционное фосфорилирование общих ядерных белков головного мозга крыс на разных стадиях онтогенеза	134
<i>Абрамян Г. Э., Чаплян С. Г., Исаджанян М. А., Кирикосова А. С., Галоян А. А.</i> Очистка ФДЭ циклических нуклеотидов гипоталамуса методом гидрофобной ВЭЖХ	140
<i>Бархударян Н. А., Келлерман И., Лотипайх Ф., Галоян А. А.</i> Гемоглобин—предшественник коронаросуживающих пептидных факторов	146
<i>Бархударян Н. А., Орос Ф., Лилиом К., Барсегян К. С., Овади Ю., Галоян А. А.</i> Новые данные о связывании коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса с кальмодулином	156
<i>Клюшник Т. П., Спундз А. Я., Яковлев А. Г.</i> Снижение количества креатинфосфокиназы мозга при шизофрении, выявляемое методом двумерного электрофореза водорастворимых белков	167
<i>Майзелис М. Я., Заблудовский А. Л., Шихов С. Н.</i> Применение стимуляторов синтеза белков для экспериментальной терапии нарушений функции и метаболизма мозга, вызванных пренатальной алкоголизацией	174
<i>Чаева Л. С., Фомичева Ю. В., Опарина Т. И.</i> Влияние гипервитаминоза А на метаболизм цереброзидов и сульфocereброзидов головного мозга	181
<i>Волков Г. Л.</i> Транспорт катионов и органических соединений в клетке нейробластомы С 1300 с различным содержанием холестерина в плазматической мембране	189
Краткие сообщения	
<i>Маслова Г. Б., Шинкина Г. Т.</i> Влияние андрогенов на циркадный ритм S_1 серотониновых рецепторов мозга	196
<i>Карпова И. В., Городинский А. И.</i> Рецепторное связывание глутамата и стриаума обученных и необученных крыс	201
<i>Шаншишвили Л. В., Микеладзе Д. Г.</i> Действие пептидных фрагментов основного белка миелина на связывание $[^{3H}]$ диализема с синаптическими мембранами мозга	204
<i>Галоян А. А., Чаплян С. Г.</i> Пептидная карта гипоталамуса	208
<i>Насибуллин Б. А., Розанов В. А., Яновский М. Б.</i> Анализ вклада различных метаболических путей в биоэнергетику основных звеньев вестибулярного анализатора	212
<i>Ситмуратова О. Х., Леонтьев В. Б.</i> Влияние гликопротеинов на транскрипционную активность ядер нейронов головного мозга	218

Обзоры

Этингер Р. Н. О молекулярной структуре нейрорецепторов	221
Воейков В. Л. Структура и функции β -адренергических рецепторов	235

Рецензии

Парсиданян Г. К., К.У.М. Сынт. Элементы молекулярной нейробиологии	250
--	-----

Хроника

Анатолий Тимофеевич Пикулев (к 60-летию со дня рождения)	252
Расковский К. С. 13-я конференция Международного общества нейрохимии	254

CONTENTS

<i>Gersh'ain L. M., Dorodova E. L., Popova N. G., Veskov R., Stolicovich M., Pecorich S., Stuka'ov P.</i> Neurochemical and Neurophysiological Changes in the brain induced by tetrazapilide tufisin in conditions of experimental epilepsy	113
<i>Tomasian E. K., Antonian A. A., Kosharian M. G., Rosanov V. A., Gerasim'yuk G. R., Arutunian A. V.</i> The participation of NAD in the processes of GABA synaptosomal release and binding in rat brain	121
<i>Yermakov N. V., Ishkov A. G., Mikerov S. V.</i> Kinetic parameters of human brain MAO concerning dopaminergic neurotoxin MPTP	128
<i>Velichkova A., Tencheva Z.</i> The effect of morphine treatment on posttranslational phosphorylation of the rat brain total nuclear proteins during various stages of ontogenesis	134
<i>Abrahamian G. E., Chailyan S. G., Isajanyan M. A., Kirakosova A. S., Galoyan A. A.</i> Resolution of hipotalamus cyclic nucleotide phosphodiesterases by hydrophobic HPLC	140
<i>Barkhudaryan N. A., Kellermann J., Lottspeich F., Galoyan A. A.</i> Hemoglobin, the precursor of coronar-constrictory peptide factors	146
<i>Barkhudaryan N. A., Orosz F., Liljotom K., Barsegian K. S., Ozadi J., Galoyan A. A.</i> New data on binding hypothalamic coronarconstrictory peptide factors with calmodulin	155
<i>Kljushnik T. P., Spunde A. Y., Yakovlev A. G.</i> Decrease of creatin phosphokinase BB content in water-soluble fraction of schizophrenic brains revealed by two-dimensional electrophoresis	167
<i>Maizelis M. Ya., Zahlydovsky A. L., Shikhov S. N.</i> Use of proteins synthesis stimulants for experimental therapy of brain functioning and metabolism disturbances induced by prenatal alcoholisation	174
<i>Chavira L. S., Fomicheva Y. V., Oparina T. I.</i> The effect of hypervitaminosis A on the metabolism of brain cerebroside and sulfo cerebroside	181
<i>Volkov G. L.</i> Cation and organic compounds transport into neuroblastoma C 13 O cells with altered cholesterol content in plasma membrane	189

Short communications

<i>Maslova G. B., Shishkina G. T.</i> Effects of androgens on circadian variations of 5-HT ₁ receptors in the rat brain	196
<i>Karpo A. I. V., Gorodinsky A. I.</i> Glutamate receptor binding in the striatum of the trained and untrained rats	201
<i>Shanashiasheili I. V., Mikeladze D. G.</i> The action of peptide fragments of myelin basic protein on [³ H] diilazem binding with brain synaptic membranes	204
<i>Galoyan A. A., Chailyan S. G.</i> The peptide mapping of hypothalamus	208
<i>Nasibullin B. A., Rozanov V. A., Yanovskiy M. B.</i> The analysis of the bioenergetics of vestibular analyzer neurons	212
<i>Saitmuralova O. H., Leontjev V. B.</i> Effect of glycoproteins upon the transcriptional activity of brain neurons nuclei	21

Reviews

<i>Etingof R. N.</i> About neuroreceptor molecular structure: advances and difficulties	221
<i>Vozycikov V. L.</i> Structure and function of β -adrenergic receptors	235

Comments

<i>Parsadanian G. K.</i> C. U. M. Smith. Elements of molecular neurobiology . . .	250
---	-----

Chronicles

In commemoration of the 69th anniversary of A. T. Pilku'er	252
<i>Fayetsky K. S.</i> 13th ISN Meeting	254