

Т. 11, № 1, 1992

ISSN 0203-393X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՂՈՔԻՆԻԿԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

НЕЙРОХИМИЯ
ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 11, ВЫП. 1.
ЯНВАРЬ—МАРТ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЕНИИ
ЕРЕВАН 1992

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

А. ЛАПТА (США)—соредактор

Н. Ф. АБРОЗА, Г. В. АПРИКЯН, Н. Г. АЛЕКСИДЗЕ, А. В. АРУТЮНЯН.

И. П. АШМАРИН, Н. А. БАРХУДАРЯН (отв. секретарь), Р. Н. ГЛЕБОВ,

К. Г. КАРАГЕЗЯН (зам главного редактора)

В. С. ОГАНЕСЯН, А. Т. ВИКУЛЕВ, К. С. РАЕВСКИЙ, Г. С. ХАЧАТРЯН,

В. ВОЛЬТЕР (Германия), К. ХЕЙЦМАН (Швейцария)

Редакционный совет

М. Н. АГАДЖАКОВ, А. Ю. БУДАНЦЕВ, В. А. БЕРЕЗИН, М. А. ДАВТЯН,

С. А. ДАМБИНОВА, И. И. ДЕМИН, И. Д. ЕЩЕНКО, Б. И. МАПУХИН,

Д. Г. МИКЕЛАДЗЕ, И. К. ПОПОВА, В. Н. РОЗЕНГАРТ, Е. С. СЕВЕРИН,

В. П. СКУЛАЧЕВ, Л. Я. ТЯХЕПЫЛД, С. Х. ХАЙДАРЛИУ, Е. М. ХВАТОВА,

Р. И. ЭТИНГОФ, ДЖ. ХАШИМ (США)

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

Сдано в набор 19. 06. 1992 г. Подписано к печати 09. 07. 1993 г.
Формат 70×108¹/₁₆. Бумага № 1 «сыктывкарская». Высокая печать.
Печ. лист. 8,0. Усл.-печ. лист. 11,2. Усл. кр. от. 11,2. Учет.-изд. 8,95.
Тираж 485. Заказ 95. Издат. 8032. Цена 100 р.
Адрес редакции: 375044, Ереван, ул. П. Севака 5/1.
Издательство АН Армении, 375019, Ереван, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

Журнал «НЕЙРОХИМИЯ» (орган АН СССР и АН Армении) основан в 1982 г. В нем публикуются статьи по актуальным вопросам функциональной нейрохимии, касающимся структуры и биологической роли специфических белков, нейропептидов, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, липидов и других соединений нервной ткани, биохимии трансмиттеров и их рецепторов, глии и нейронов, хромаффинных гранул и т. д.

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

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

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

РЕДКОЛЛЕГИЯ

НЕКОТОРЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА
И СЕКРЕЦИИ АЦЕТИЛХОЛИНА В ХОЛИНЕРГИЧЕСКИХ
ТЕРМИНАЛЯХ МОЗГАДОЛГО-САБУРОВ В. Б., ПОДОСИНОВИКОВА Н. П., САНКОВСКИЙ А. А.

Институт токсикологии, Ленинград

Изучено влияние холинэргических агонистов, холиномиметиков и бисчетвертичного иридиневого оксимы ТМБ-4 на Ca^{2+} -зависимый K^{+} -стимулируемый выброс АХ из пресинаптических нервных окончаний переживающих срезов коры головного мозга крыс. Показано, что все соединения стимулируют выброс АХ с значениями EC_{50} близкими к константам сродства к пресинаптическим M_2 -холинорецепторам. Полный агонист мускариновых холинорецепторов (М-ХР) карбамахолин (КХ) и оксим ТМБ-4 тормозят выброс медиатора. Частичный агонист пиллокарпин, подобно антагонистам, стимулирует выброс АХ. Предполагается два пути торможения выброса медиатора: трансрецепторный, опосредуемый фосфоинозитидной системой и независимый от активационной системы вторичных мессенджеров, и внерецепторный, не связанный с активацией гидролиза фосфоинозитидов, характерный для бисчетвертичных иридиневого оксимы. Не обнаружено влияния КХ и ТМБ-4 на синтез АХ в центральных холинергических терминалях.

Проблема регуляции синаптической передачи на протяжении многих десятилетий привлекает к себе пристальное внимание. При этом наибольший интерес вызывают механизмы регуляции функционального состояния нервной терминали, призванные оптимизировать освобождение в синаптическую щель нейромедиаторов и позволяющие таким образом работать синапсу в эффективном и экономичном режиме.

В настоящее время считается установленным факт саморегуляции выброса АХ пресинаптическими аутохолинорецепторами по принципу отрицательной обратной связи. Доказательством трансрецепторного пути ингибирования выброса АХ служат эксперименты с использованием М-холинolitikов. Холинергические антагонисты, блокируя пресинаптические М-холинорецепторы, предотвращают активацию их АХ и нарушают механизмы ауторегуляции его секреции, что приводит к увеличению количества медиатора в синаптической щели. Остаются невыясненными биохимические механизмы ингибирования АХ собственного выброса. Как известно, возбуждение М-ХР сопряжено с изменением функционального состояния вполне определенных систем вторичных мессенджеров: стимуляцией фосфоинозитидного и ингибированием аденилатциклазного ответов. Логично предположить

возможность участия этих систем в качестве биохимических посредников трансрецепторной регуляции выброса АХ. Некоторые экспериментальные подходы к решению этого вопроса и составили содержание настоящего сообщения.

Материалы и методы

Работа выполнена на белых крысах-самках линии *Wistar* массой 180—200 г. Исследование высвобождения АХ проводили на переживающем срезе мозга. Крыс декапитировали, мозг извлекали и делали срез толщиной 350 ± 50 мкм с теменной области правого полушария. На 2-й мин после декантации срез помещали в колбу, содержащую 2 мл предварительно барбитированного карбогенном при 37° бикарбонатного буфера, рН 7,4. Буферная смесь имела следующий состав: (ммоль/л): NaCl—125; KCl—5,0; CaCl₂—2,7; KН₂PO₄—1,25; MgSO₄—1,25; NaHCO₃—15,0; Na₂HPO₄—14; глюкоза—10. Колба со срезом барбитировалась повторно, герметично закрывалась и помещалась в водяную баню с непрерывным встряхиванием (120 качаний в мин) при 37° . Стадия преникубации продолжалась до 30-й мин, предшествовала любым манипуляциям со срезом и была необходима для восстановления активности ткани после препаративной травмы. После преникубации срез помещали в среду того же состава, но содержащую 0,1 мкмоль [³H]холина («Amersham», Англия, 70 Ки/ммоль). Оценка кинетических параметров насыщения среза меченым холином показала, что в первые 30 мин инкубации включение метки на единицу массы среза идет линейно с достаточно высокой скоростью. В дальнейшем для всех опытов была выбрана экспозиция срезов с [³H]холином продолжительностью 15 мин. Параметры отмывки исследовали в опытах с непрерывным последовательным переносом среза каждые 2 мин в колбу со свежим буфером. Практически полная отмывка от невключившейся метки происходила к 16—20 мин. В дальнейших экспериментах после насыщения холином срез отмывали в «чистом» буфере дважды по 10 мин.

Индукцированное высвобождение АХ исследовали в условиях деполяризации среза избытком K⁺ (25 мМ KCl). Результаты оценивали интегральным показателем накопления метки за 15 мин деполяризации и выражали величиной «доли выброса» не менее чем в шести независимых опытах—D (%).

$$D(\%) = \frac{\text{радиоактивность выброса (распады/мин)}}{\text{радиоактивность выброса} + \text{радиоактивность гомогената (распады/мин)}} \times 100$$

Идентификацию [³H]АХ и [³H]холина проводили в суперфизате и гомогенате срезов мозга в отсутствие или в присутствии 10^{-4} М эзерина. Разделение холина и АХ проводили методом ВЭЖХ на хроматографе «Altex» (США) с идентификацией пиков спектрофотометрическим методом.

Определение средства холинотропных лигандов к M_1 -ХР больших полушарий мозга и M_2 -ХР миокарда крыс проводили методом радиолигандного анализа. В качестве меченого лиганда использовали [3H] хиноклидинилбензилат («Amersham», Англия) с величиной У.А. 30,0—37,0 Ки/ммоль. Детали постановки экспериментов описаны ранее [1]. О средстве немеченых соединений к рецепторам судили по величине константы конкурентного ингибирования (K_i) связывания меченого лиганда. Для селективных холинолитиков и холинергических агонистов методом нелинейного регрессионного анализа на персональном компьютере IBM PC AT по специально разработанной программе рассчитывали константы высокого (K_{high}) и низкого (K_{low}) средства к рецепторам и процентное содержание участков соответствующего средства в общей популяции ХР.

Результаты и обсуждение

В связи с тем, что целью настоящего исследования явилось изучение механизмов трансрецепторного регулирования выброса АХ, были оценены параметры взаимодействия интересующих нас холинотропных соединений с ХР больших полушарий мозга, до 80% которых представлены М-подтипом и с ХР миокарда, до 90% популяции которых составляют M_2 -ХР. Полученные данные представлены в табл. 1.

Следующим этапом работы явилось изучение влияния холинергических лигандов на стимулированный каллевой деполяризацией выброс АХ из пресинаптических нервных окончаний переживающих срезов коры мозга крыс.

Все исследованные холинолитики стимулируют индуцированный K^+ выброс АХ (рис. 1, табл. 2). При сопоставлении влияния на выброс (величина EC_{50} по активации выброса, табл. 2) со средством антагонистов к М-ХР (величина K_1 ; табл. 1) привлекает внимание хорошее совпадение параметров связывания селективных холинолитиков пирензепина и имперналина с M_3 -подтипом ХР с их значениями EC_{50} по влиянию на выброс АХ. Эти результаты совпадают с литературными данными о принадлежности пресинаптических аутохолинорецепторов коры больших полушарий к M_2 -подтипу [2, 3] и подтверждают представления о том, что холинблокаторы стимулируют пресинаптический выброс АХ именно за счет блокады ХР. Очевидно, используемая модель адекватна поставленной задаче и позволяет сопоставлять связывание лигандов с рецепторами с их влиянием на пресинаптический выброс АХ.

M_2 -селективный холинблокатор имперналин, в малых концентрациях стимулировавший выброс медиатора, в концентрации более 10^{-6} М начинает ингибировать его. Мы не располагаем экспериментальным материалом для объяснения этого эффекта, можно лишь предполагать, что в спектре действия препарата могут присутствовать [Н] холинблокирующие свойства, которые и вызывают эф-

фекты, противоположные влиянию М-холинблокаторов. Подобного рода противоположно направленное действие на выброс АХ М- и Н-составляющих таких агонистов, как АХ и метахолин, показано, в частности, на препарате синапсом коры мозга крыс [4].

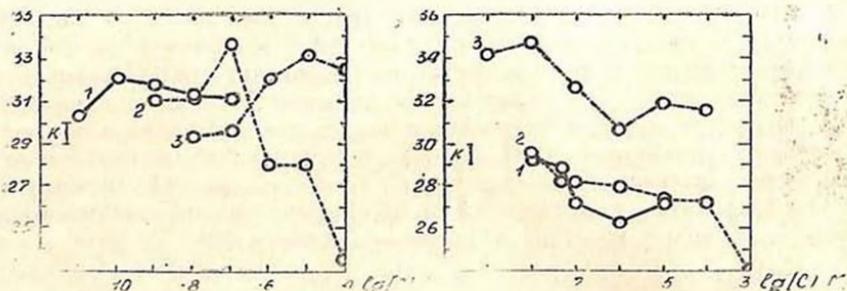


Рис. 1. Влияние холинolitikов на стимулированную кальевой деполяризацией выброс АХ. 1-глицин, 2-империптин, 3-пирепезин, К—доля выброса в контроле. По оси ординат—доля выброса, в %.

Рис. 2. Влияние холинотиметиков и ТМБ—4 на стимулированную кальевой деполяризацией выброс АХ. 1—ТМБ—4, 2—карбамилхолин, 3—пилокарпин, К—доля выброса в контроле. По оси ординат—доля выброса, в %.

Таблица 1

Параметры связывания холинергических лигандов с М-холинорецепторами

Холинергический лиганд	M ₁ -ХР мозга		M ₂ ХР миокарда			
	K _i [M]		K _i [M]	M ₂ /M ₁		
Глицин	6,6 · 10 ⁻¹⁰		6,2 · 10 ⁻¹⁰	1		
Пирепезин	3,0 · 10 ⁻⁸ 78%	1,0 · 10 ⁻⁶ 19%	1,2 · 10 ⁻⁶	40		
Империптин	2,7 · 10 ⁻⁷		4,9 · 10 ⁻⁸	0,2		
	K _{high}	K _{low}	L/H	K _{high}	K _{low}	L/H
Карбамилхолин	1,5 · 10 ⁻⁶ 41%	6,8 · 10 ⁻⁵ 59%	45	5,0 · 10 ⁻⁷ 61%	6,3 · 10 ⁻⁶ 19%	13
Пилокарпин	9,5 · 10 ⁻⁶ 100%		1	9,8 · 10 ⁻⁶ 100%		1
ТМБ—4	3,7 · 10 ⁻⁶ 100%		1	3,4 · 10 ⁻⁶ 75%	1,1 · 10 ⁻⁵ 25%	3

Примечание. M₂/M₁—отношение констант средства холинотиметика к соответствующим подтипам М—ХР. L/H—отношение констант низкого и высокого средства лигандов в пределах данного подтипа рецепторов

Для изучения механизмов торможения выброса АХ были выбраны два прямых холинэргических агониста — карбамилхолин (КХ) и пилокарпин, первый из которых является полным холинэргическим агонистом и способен, подобно АХ, вызывать достаточно выраженный аденилатциклазный и фосфоинозитидный ответы. Пилокарпин представляет собой частичный агонист с сильно редуцированной или полностью отсутствующей (по различным литературным источникам) способностью индуцировать образование вторичных мессенджеров в фосфоинозитидной сигнальной системе [5, 6]. При сравнении действия КХ и пилокарпина на индуцированный K^+ -деполяризацией выброс АХ предполагалось оценить участие фосфоинозитидной системы вторичных мессенджеров в процессе ингибирования освобождения медиатора. Полученные результаты представлены на рис. 2 и в табл. 2. КХ ингибирует пресинаптический выброс АХ с значением $EC_{50} =$

Таблица 2

Влияние холинэргических соединений на индуцированное калиевой деполяризацией высвобождение ацетилхолина из срезов коры мозга крыс

Холинэргический лиганд	EC_{50} (M) по активации выброса АХ	EC_{50} (M) по ингибированию выброса АХ
Галланин	$6,0 \cdot 10^{-11}$	—
Пир-изепин	$1,0 \cdot 10^{-6}$	—
Империялин	$2,0 \cdot 10^{-8}$	—
Карбамилхолин	—	$8,5 \cdot 10^{-5}$
Пилокарпин	$4,0 \cdot 10^{-7}$	—
ТМБ-4	—	$7,5 \cdot 10^{-8}$

$8,5 \cdot 10^{-5}$ М. Пилокарпин не проявляет ингибирующего действия; он, подобно холинэргическим агонистам, стимулирует пресинаптический выброс АХ. Представленные данные свидетельствуют о том, что опосредуемое М-ХР торможение K^+ -стимулированного пресинаптического выброса АХ осуществляется лишь теми холинэргическими агонистами, которые способны активировать фосфоинозитидную систему вторичных мессенджеров. Очевидно, биохимические пути трансрецепторного ингибирования выброса АХ по известному механизму отрицательной обратной связи включают активацию этой системы. В то же время, полученные результаты не дают оснований для предположения об участии в торможении выброса медиатора аденилатциклазы. Принципиальным отличием пилокарпина, как частичного агониста, от антагонистов является его способность ингибировать аденилатциклазу. По литературным данным, значение EC_{50} пилокарпина в тесте ингибирования аденилатциклазного ответа составляет порядка $3 \cdot 10^{-6}$ М [7]. Мы исследовали действие пилокарпина на выброс АХ в диапазоне концентраций от 10^{-9} до 10^{-4} М. Очевидно, в этих условиях пилокарпин был способен изменять циклазную активность, однако он не оказывал на выброс медиатора действия, отличного от холинэргического.

ров, не влияющих на активность этого фермента. Полученные данные позволяют предположить, что аденилатциклазная система вторичных мессенджеров не участвует в передаче сигнала от пресинаптического М-ХР к биохимическим системам первой терминали, регулирующим выброс АХ.

Интересную группу модуляторов пресинаптического выброса АХ представляют собой бисчетвертичные пиридининовые оксиды. Впервые способность соединений этого класса тормозить K^+ -стимулированный выброс АХ из срезов продолговатого мозга крыс была показана J. Kloog и соавт. в 1986 г. [8]. Авторы представляют данные соединения в качестве селективных пресинаптических агонистов M_1 -ХР продолговатого мозга, способных взаимодействовать с постсинаптическими рецепторами как холинергические антагонисты. В наших экспериментах на пресинаптических M_2 -ХР срезах коры мозга крыс оксим ТМБ-4 также тормозил Ca^{2+} -зависимый K^+ -стимулируемый выброс АХ (табл. 2, рис. 2). Радиолигандный анализ свидетельствует о том, что по характеру связывания ТМБ-4 аналогичен частичным холинергическим агонистам (типа пилокарпина) с очень незначительным различием констант высокого и низкого сродства к рецепторам (табл. 1). Согласно литературным данным, этот факт свидетельствует о крайне редуцированном фосфонозитидном ответе холиномиметика [5, 6]. В то же время, ТМБ-4, в отличие от пилокарпина очень активно ингибирует выброс АХ.

В специально проведенной серии экспериментов было показано, что КХ и ТМБ-4 не оказывают влияния на синтез АХ в холинергических терминалях. В условиях блокады холинэстеразы эзеринном исследовался синтез АХ из меченого [3H] холина в нерезвивающих срезах мозга. Методом ВЭЖХ было показано развивающееся во времени линейное накопление [3H] АХ в срезах. КХ и ТМБ-4 не оказывали влияния на этот процесс.

Представленные факты позволяют сделать одно из предположений: либо пилокарпин является структурно обусловленным исключением в ряду частичных холинергических агонистов и его неспособность ингибировать выброс медиатора не связана с редукцией фосфонозитидного ответа, либо бисчетвертичные пиридининовые оксиды, в отличие от холиномиметиков, могут регулировать пресинаптический выброс АХ не трансинаптическим путем. Авторы настоящей работы склоняются в пользу второго предположения и считают, что изучение этого пути открывает принципиально новую возможность создания эффективных неренепторных модуляторов пресинаптического выброса АХ.

CERTAIN MECHANISMS OF THE REGULATION OF ACHETYLCHOLINE SYNTHESIS AND RELEASE IN BRAIN CHOLINERGIC TERMINALS

DOLGO-SABUROV V. B., PODOSINOVIKOVA N. P., SANKOVSKI A. A.

The Institute of Toxicology, Leningrad.

The influence of cholinolytics, cholinomimetics and bisquaternary pyridinium oxime TMB-4 on the Ca^{2+} -dependent K^{+} -stimulated release of acetylcholine from presynaptic terminals of superfused slices of rat brain cortex was studied. It was shown that all cholinomimetics stimulate the acetylcholine release with the EC_{50} values to their affinity constants to M_2 -cholinoreceptors. The full agonist of muscarinic cholinoreceptors, carbamoyl choline and oxime TMB-4 inhibit the release of the mediator. The partial agonist pilocarpine stimulates like antagonists the acetylcholine release. Two path ways of mediator release inhibition are supposed:

1) the transreceptor one mediated by phosphoinositide system and therefore independent of adenylylate cyclase system of second messengers.

2) nonreceptor way nonrelated with the activation of phosphoinositide system, typical for bisquaternary pyridinium oximes. No influence of carbamylcholine and TMB 4 on acetylcholine synthesis in the central cholinergic terminals was found.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Иванова Т. М., Подосиновикова Н. П., Долго-Сабурова В. Б., Предтеченский М. Б., Степанова Н. А., Фармакол. и токсикол., т. 53, № 2, с. 34—36, 1990.
2. Raiteri M., Leardi R., Marchi M. J. Pharmacol. Exper. Therapeutics., v. 228 № 1, p. 209—214, 1983.
3. Marchi M., Raiteri M. Europ. J. Pharmacol., v. 107, p. 287—288, 1985.
4. Meyer E. M., Otero D. H. J. of Neurosci., v. 5, № 5, p. 1202—1207, 1985.
5. Freedman S. B., Harley E. A., Iverson L. L. Brit. J. Pharmacol., v. 93, p. 437—445, 1988.
6. Evans T., Hepler J. R., Masters S. B., Brown J. H., Harden T. K. Biochem. J., v. 232, p. 751—757, 1985.
7. Kinney M. M., Stenstrom S., Richelson E. Mol. Pharmacol., v. 27, p. 223—235, 1984.
8. Kloog Y., Galron R., Sokolovsky M. J. Neurochem., v. 46, № 3, p. 767—772, 1986.

Поступила 7.1.1991

УДК 577.152.311

РОЛЬ β 1-ТИМОЗИНА В РЕГУЛЯЦИИ
 Ca^{2+} -КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМЫХ ПРОЦЕССОВ МОЗГА
(РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ФДЭ
ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ)

ГАЛЮЯН А. А., ЧАИЛЯН С. Г., АБРАМЯН Г. Э.

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

С помощью метода аффинной ВЭЖХ на колонках PDE-Biosphere и CaM-Biosphere показано, что в присутствии Ca^{2+} и Mg^{2+} β 1-тимозин гипоталамуса необратимо связывается с кальмодулином. Это свойство проявлялось в существенной инактивации индуцированной кальмодулином ферментативной активности ФДЭ, ограничивающейся уровнем базальной активности фермента. Определенные графически и методом аффинной ВЭЖХ с зональным элюированием эффективные константы ингибирования и K_d свидетельствуют о явно выраженном эффекте кооперативности при взаимодействии убиквитина с кальмодулином. Предполагается, что на молекуле кальмодулина имеются специфические центры связывания, при взаимодействии с которыми β 1-тимозин приводит к подавлению активирующего действия кальмодулина на фермент.

Число работ, в которых кальмодулину приписывают регуляторную роль в различных клеточных процессах, быстро растет: список чувствительных к кальмодулину систем пополняется все новыми и новыми наименованиями. Показано, что с кальмодулином связываются Ca^{2+} -зависимым образом многие белки и пептиды (β -эндорфин, АКГГ, глюкагон, соматостатин, основной белок миелина, гистоны [1], различные низкомолекулярные соединения, в том числе и лекарственные соединения [2, 3]. Однако множество наблюдаемых *in vitro* реакций, происходящих с участием кальмодулина, еще не означает возможность существования подобных взаимодействий *in vivo*. Можно предположить, что увеличение гидрофобности молекулы кальмодулина вследствие ее конформационных изменений, индуцированных связыванием Ca^{2+} [4], наряду со специфическими реакциями порождает целый ряд наблюдаемых в экспериментальных условиях неспецифических взаимодействий кальмодулина с различными белками, пептидами, компонентами мембран, обладающими гидрофобными свойствами. При этом следует отметить, что связывание кальмодулина далеко не всегда является Ca^{2+} -зависимым [5], а некоторые кальмодулинзависимые ферменты обладают Ca^{2+} -связывающими свойствами [6, 7]. По-видимому, лишь немногие из чувствительных к кальмодулину *in vitro* систем являются мишенями действия каль-

модулина в интактной клетке. При низком внутриклеточном уровне ионов кальция многие функции, приписываемые кальмодулину, выполняются Ca^{2+} -независимыми регуляторными механизмами. В этой связи особый интерес представляют обнаруженные в гипоталамусе пептидные системы под общим названием С-модулины [8], характерной особенностью которых является регуляция активности Ca^{2+} -кальмодулинчувствительных процессов в отсутствие Ca^{2+} и кальмодулина [9].

В представленной работе обсуждаются некоторые аспекты регуляции ферментативной активности ФДЭ циклических нуклеотидов под действием β 1-тимозина (убиквитин 74).

Материалы и методы

В работе были использованы cAMP, cGMP, ЭГТА, препараты кальмодулина и 5'-нуклеотидазы из яда *Opheophagus Hannah* („Sigma“, США), Dowex 1x2, tris-HCl , MgCl_2 , CaCl_2 , NaN_3 („Serva“, Германия); фенил-сефароза („Pharmacia“, Швеция), $8\text{-}^3\text{H-cAMP}$, $8\text{-}^3\text{H-cGMP}$ все остальные реактивы—отечественного производства квалификации ос. ч. Очистку ФДЭ осуществляли по методу, предложенному ранее [10], с некоторыми модификациями. Измельченную ткань гипоталамуса (100 г), хранившуюся при температуре -70° , гомогенизировали 3—5 мин в 300 мл буферного раствора А, содержащего 25 мМ tris-HCl , pH 7,0, 2 мМ MgCl_2 , 0,2 М NaCl при 4° на гомогенизаторе „Политрон“. Гомогенат центрифугировали в течение 60 мин при 24000 g («Beckman G-21», ротор JA-14, США). В супернатант добавляли CaCl_2 в конечной концентрации 2 мМ и наносили на колонку фенил-сефарозы, предварительно уравновешенную буфером В, содержащим 0,2 М NaCl . Скорость элюции составляла 3 мл/мин. ФДЭ элюировали буфером В с добавлением 0,2 мМ ЭГТА со скоростью элюции 2 мл/мин. Контроль осуществляли по изменению оптической плотности (λ -280 нм) и ФДЭ активности. Все операции проводили при 4° жидкостным хроматографом умеренного давления FPLC «Pharmacia» (Швеция). Элюат с фенил-сефарозы, обладающий наибольшей ферментативной активностью (30 мл), концентрировали ультрафильтратором «Amicon» (США) на мембране PM-30 (Pellicon membrane 30000). Давление в ячейке поддерживали на уровне 3,5 атм при 0° .

1 мл сконцентрированного фермента наносили на колонку с гидрофобной смолой Shodex HIC PH-814 (0,75x8 см), предварительно уравновешенную 0,1 М фосфатным буферным раствором С, pH 7,0, 1 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ и 2 мМ CaCl_2 . Колонку промывали 50 мл буфера С. Элюцию ФДЭ осуществляли линейным градиентом сульфата аммония от 1 до 0 М за 60 мин в присутствии 2 мМ 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 и степенью активации кальмодулином, объединяли и концентрировали с использованием ультрафильтратора «Amicon» на мембране РМ-30. Концентрат в количестве 1 мл наносили на tandemную систему колонок с аффинным сорбентом СаМ-Biosphere (1×5 см), где в качестве иммобилизованного лиганда использовали кальмодулин, предварительно уравновешенных 0,1 М фосфатным буфером С, рН 7,0, содержащим 1,8 М сульфат аммония, 2 мМ СаСl₂, 0,1 мМ ЭГТА и 10%-ный глицерин. Колонки промывали тем же буфером, после чего первую колонку отсоединяли и регенерировали. Элюцию ФДЭ с колонки 2 на одноразовый концентрирующий патрон сAMP-Biosphere осуществляли в режиме линейного градиента сульфата аммония от 1 до 0 М в присутствии 2 мМ ЭГТА и 20%-ного глицерина при скорости потока 0,3 мл/мин за 60 мин. Полученный препарат ФДЭ, согласно данным электрофореза в ПААГ и гельпроникающей ВЭЖХ на колонке TSK-Biosphere (7,5×650 мм), был гомогенным и хранился в 40%-ном глицерине при -20° в течение одного месяца. За это время активность фермента и степень активации существенно не менялись.

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson и Appleman [11] с применением меченого 8 [³H]сAMP или 8 [³H]сGMP. Инкубационная смесь (200 мкл) содержала 50 мМ трис-НСl, рН 7,0, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ СаСl₂ или 2 мМ ЭГТА, 100 кБк 8 [³H]сAMP или 8 [³H]сGMP, 5 мМ β-меркаптоэтанол и 5 мкМ сAMP. 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 Ornithinus Hannah. Реакцию, катализируемую этим ферментом, проводили при 30° в течение 10 мин. Сорбцию негидролизованного субстрата осуществляли на ионообменнике Dowex 1×2 (Сl-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 (гидролиз субстрата % — мкМ/мкл·мин).

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что аффинная ВЭЖХ на колонках Biosphere, где в качестве неподвижной фазы применялись иммобилизованные на силикагеле Са²⁺-кальмодулинзависимые ферменты, позволяет определять некоторые физико-химические и кинетические параметры регуляции активности этих ферментов биологически актив-

ными соединениями [12]. С помощью представленной методики аффинной ВЭЖХ на колонках PDE-Biosphere и CaM-Biosphere было изучено влияние β 1-тимозина на физико-химические параметры взаимодействия ФДЭ циклических нуклеотидов и кальмодулина.

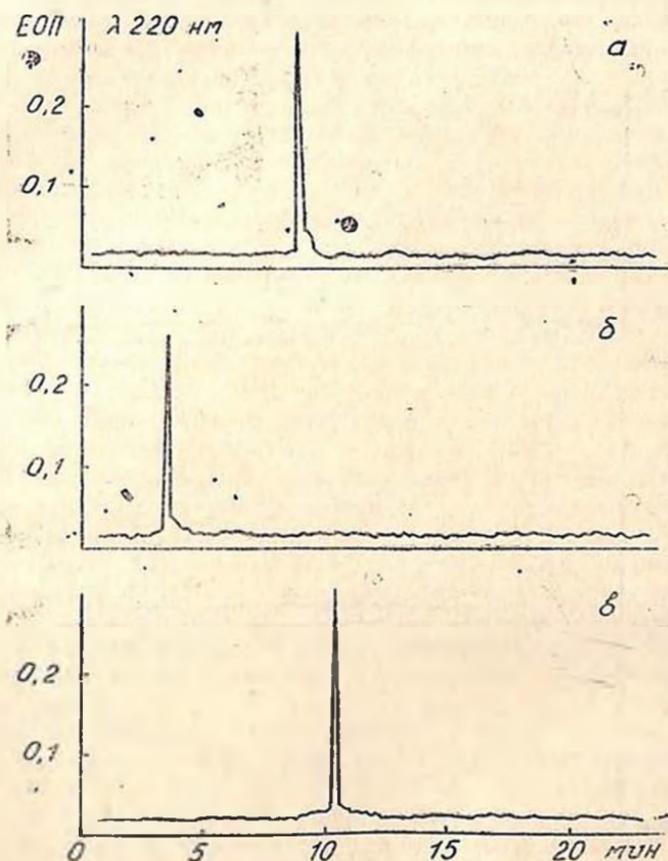


Рис. 1. Аффинная ВЭЖХ на колонке PDE-Biosphere кальмодулина (а), β 1-тимозина (б) и комплекса кальмодулин- β -тимозина (в). Эксперимент проводили в режиме изократического элюирования 0,1 М фосфатным буфером, рН 7,0 содержащим 5 мМ $MgCl_2$, 2 мМ $CaCl_2$ или 2 мМ ЭГТА и 0,5 М сульфата аммония. Скорость потока 0,5 мл/мин при температуре 36°. Обнаружение продукта осуществляли при поглощении оптической плотности λ 210 нм

На рис. 1 представлены результаты аффинной ВЭЖХ кальмодулина на колонке PDE-Biosphere. Поскольку нанесение образца на колонку происходит в присутствии высоких концентраций Ca^{2+} (0,2 мМ), во взаимодействие с PDE-Biosphere вступает комплекс Ca^{2+} -кальмодулин. Как видно из рис. 1, а, действие ЭГТА приводит

и появлению белкового пика. Таким образом, связывание β 1-тимозина на PDE-Biosphere имеет явно выраженный Ca^{2+} -зависимый характер. При потере ионов кальция под действием хелатирующего агента происходят изменения в гидрофобных свойствах молекулы кальмодулина, приводящие к быстрой потере способности регуляторного белка связываться с иммобилизованным ферментом. На рис. 1, б представлена хроматограмма элюции β 1-тимозина с ко-

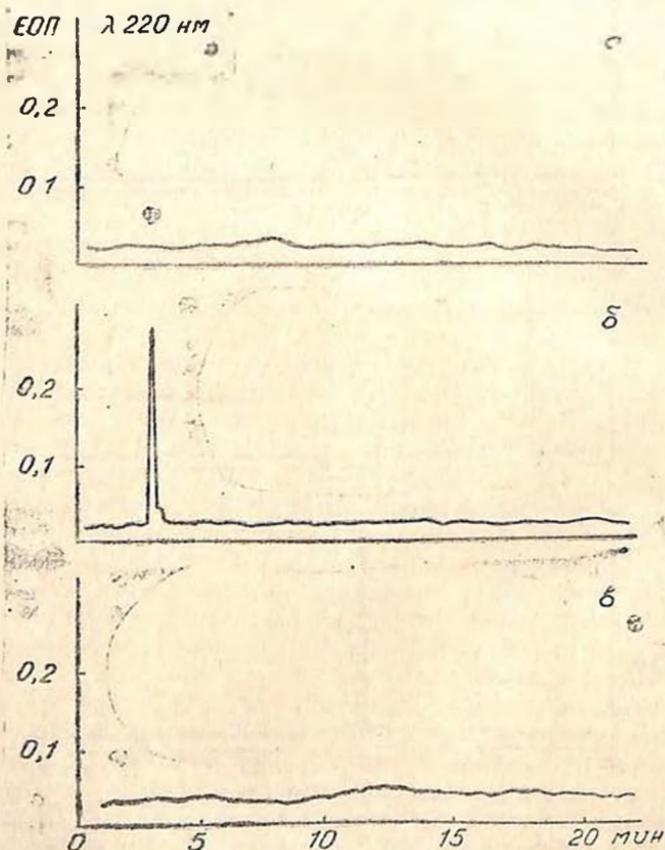


Рис. 2. Аффинная ВЭЖХ β 1-тимозина на колонке CaM-Biosphere в присутствии: а—ионов кальция, б—ЭГТА, в—антагониста кальмодулина W-7. Условия эксперимента те же, что и на рис. 1.

лонки PDE-Biosphere, которая достигается уже при незначительном изменении элюирующей силы как в присутствии, так и в отсутствие ионов кальция. Десорбция β 1-тимозина, по всей видимости, происходит непосредственно после его элюции, то есть с некоторой временной задержкой по отношению к началу действия элюента.

Поэтому маловероятно, что $\beta 1$ -тимозин обладает сколь-нибудь существенным сродством к молекуле ФДЭ, и связывание с иммобилизованным ферментом является следствием неспецифической сорбции на поверхности ФДЭ за счет ее гидрофобности. На рис. 1, *в* представлены результаты хроматографии кальмодулина на колонке PDE-Biosphere в присутствии $\beta 1$ -тимозина. При наличии ионов кальция и $\beta 1$ -тимозина элюция в режиме изократического элюирования приводит к появлению белкового пика, смещенного в шкале времени по отношению к пику, соответствующему белковому пику $\beta 1$ -тимозина и кальмодулина. При этом, если предположить диссоциацию комплекса кальмодулин—ФДЭ в объеме колонки в присутствии Ca^{2+} и в отсутствие $\beta 1$ -тимозина, что противоречит результатам вышеизложенного эксперимента (рис. 1, *а*), то элюция с колонки должна была привести к появлению двух белковых пиков вместо наблюдаемого одного, соответствующего пику выхода $\beta 1$ -тимозина (рис. 1, *б*). Следовательно, десорбция кальмодулина с колонки PDE-Biosphere носит явно выраженный $\beta 1$ -тимозинзависимый характер. Можно предположить, что $\beta 1$ -тимозин при избыточной концентрации ионов кальция приводит к диссоциации комплекса кальмодулин—ФДЭ за счет связывания с доступными участками: либо на молекуле ФДЭ, вследствие чего ФДЭ теряет способность связывать кальмодулин, что мало вероятно, либо на молекуле кальмодулина, и как следствие при незначительном изменении элюирующей силы наступает быстрая потеря способности кальмодулина связываться с иммобилизованным ферментом с последующей элюцией последнего. Иными словами, существует возможность непосредственного взаимодействия $\beta 1$ -тимозина с кальмодулином. Для подтверждения представленной модели были проделаны хроматографические исследования на предмет изучения связывания $\beta 1$ -тимозина на колонках CaM-Biosphere (рис. 2).

Поскольку аффинная хроматография на колонке CaM-TSK происходит при высоких концентрациях Ca^{2+} , следует полагать, что элюция $\beta 1$ -тимозина возможна при помощи действия хелатирующего агента или же антагониста кальмодулина. Однако, как видно из рис. 2, *а*, на котором представлен профиль элюции $\beta 1$ -тимозина с CaM-Biosphere, действие ЭГТА и W-7 не приводит к появлению белкового пика. При удалении же ионов кальция при нанесении на колонку образца, элюция последнего возможна, однако в данном случае связывание с лигандом является неспецифическим и достигается уже при незначительном изменении элюирующей силы (рис. 2, *б*). Таким образом, связывание $\beta 1$ -тимозина с иммобилизованным кальмодулином имеет явно выраженный Ca^{2+} -зависимый и необратимый характер. Можно предположить, что $\beta 1$ -тимозин при избыточной концентрации Ca^{2+} и Mg^{2+} взаимодействует с кальмодулин-лигандом за счет открытых (доступных) областей. Наличие указанных областей связано с присутствием избытка Ca^{2+} и Mg^{2+} . Наиболее вероятно их нахождение непосредственно на иммобилизованном лиганде, пе-

жели индуцирование этих центров на поверхности $\beta 1$ -тимозина за счет независимой ассоциации $\beta 1$ -тимозина с кальмодулином. При удалении Ca^{2+} и Mg^{2+} из уравнивающего буфера, независимо от действия хелатирующего агента, происходят изменения во взаимодействии $\beta 1$ -тимозина с лигандом, приводящие к быстрой потере способности связывания с иммобилизованным кальмодулином. При

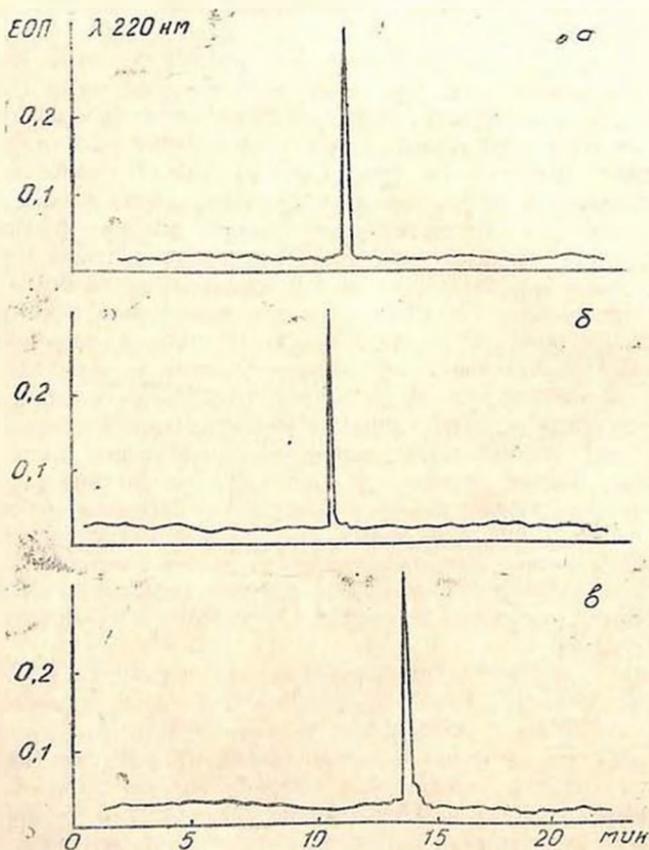


Рис. 3. Обращено-фазовая ВЭЖХ на колонке Si-300 Biosphere C-18 кальмодулина (а), $\beta 1$ -тимозина (б) и комплекса кальмодулин- $\beta 1$ -тимозин (в). Эксперимент проводили в режиме изократического элюирования ацетонитрил / H_2O / 0,1%-ная ТФУ (30-70). Скорость потока 1 мл/мин. Обнаружение продукта при λ 210 нм

193

высокой концентрации ионов кальция и магния комплекс β -тимозин-кальмодулин, по-видимому, не подвергается диссоциации в процессе элюции. Это заключение основано на результатах, представленных на рис. 2, где показано, что $\beta 1$ -тимозин связывается с иммобилизо-

панным кальмодулином Ca^{2+} -зависимым способом и не может быть элюирован под действием хелатирующего агента. Таким образом, эксперименты, проведенные с использованием CaM -Biosphere колонки, показывают, что $\beta 1$ -тимозин в присутствии ионов кальция и магния может образовать сложный комплекс с кальмодулином, изменяющий физико-химические свойства регуляторного белка. Результаты обращенно-фазовой ВЭЖХ на колонке Biosphere C-18 в режиме изократического элюирования, приведенные на рис. 3, показывают, что белковые пики соответствующие кальмодулину и $\beta 1$ -тимозину на профиле элюции лежат в различных областях. Хроматография комплекса $\beta 1$ -тимозин—кальмодулин приводит к появлению одного пика,

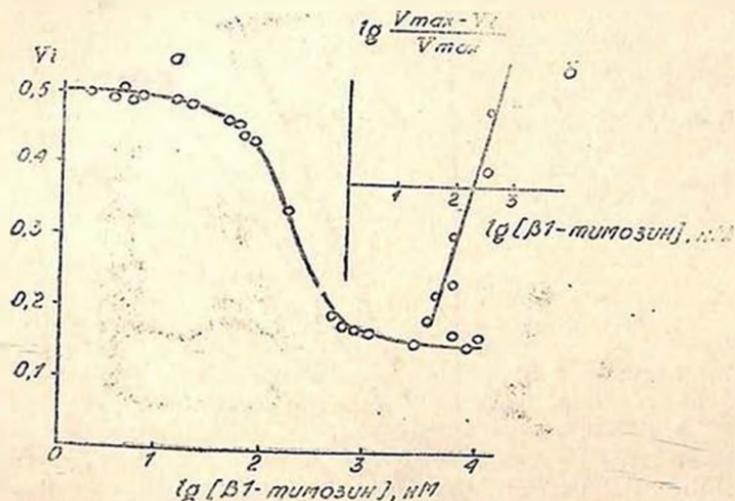


Рис. 4. Влияние $\beta 1$ -тимозина на индуцированную кальмодулином активность ФДЭ. График зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации $\beta 1$ -тимозина (а), в координатах Хилла (б). Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ CaCl_2 и 1 мкМ кальмодулина при концентрации субстрата сАМР 5 мкМ

смещенного в шкале времени изократического элюирования. Таким образом, $\beta 1$ -тимозин в присутствии ионов кальция и магния способен взаимодействовать с кальмодулином, что приводит к изменению гидрофобных свойств последнего. Определение параметров связывания с обращенной фазой в данном случае малоэффективно, поскольку при образовании сложного молекулярного комплекса изменения в гидрофобности при обращенно-фазовой ВЭЖХ непредсказуемы. Однако наблюдаемый эффект образования комплекса $\beta 1$ -тимозин—кальмодулин оказался несколько неожиданным в рамках известных на сегодняшний день сведений о физико-химических свойствах кальмодулина. Представленный ниже ряд кинетических экспериментов проделан с целью выяснения механизма взаимодействия $\beta 1$ -тимозина с кальмодулином.

На рис. 4 приведен график зависимости ферментативной активности ФДЭ от концентрации β 1-тимозина, который ингибирует индуцированную кальмодулином активность фермента по типу конкурентного ингибирования с эффективной K_i , близкой к 100 нМ. Тот же график, представленный в координатах Хилла, позволяет сделать заключение, что β 1-тимозин проявляет явно выраженный эффект

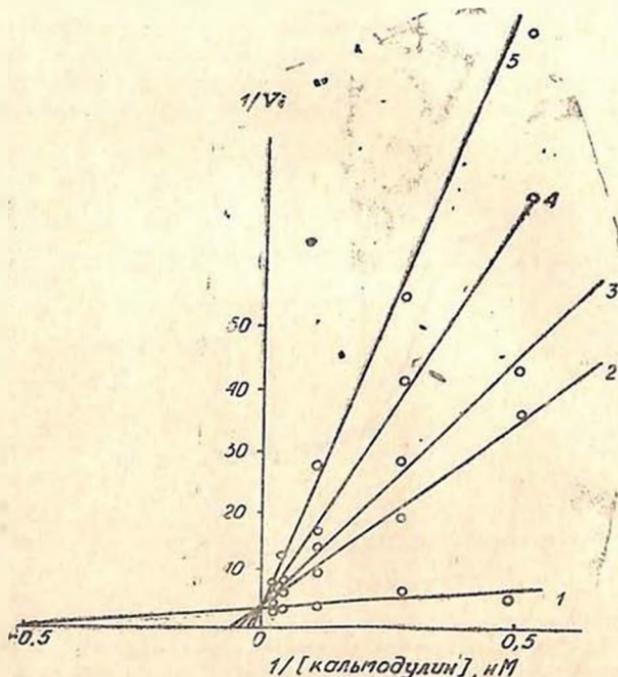


Рис. 5. Влияние β 1-тимозина на способность кальмодулина активировать ФДЭ. Зависимость начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации кальмодулина при различных концентрациях β 1-тимозина, равных (в нМ): 1—0, 2—1, 3—10, 4—100, 5—1000. Эксперимент проводили при концентрации субстрата сАМР 5 мкМ

многоцентрового связывания при взаимодействии с комплексом Ca^{2+} -кальмодулин—ФДЭ. На рис. 5 представлена зависимость активности ФДЭ в присутствии различных концентраций β 1-тимозина от концентрации кальмодулина. Эффективная константа сродства кальмодулина к ФДЭ существенно увеличивается с ростом концентрации ингибитора. Представленный на рис. 5 эффект действия β 1-тимозина следует отнести к случаю классического конкурентного ингибирования, где он выступает в качестве ингибитора. На рис. 6 представлена зависимость эффективной константы активации ФДЭ—кальмодулина от концентрации β 1-тимозина. При высоких концентра-

циях $\beta 1$ -тимозина эффективная константа стремится к предельному значению, что свидетельствует о неполном конкурентном ингибировании активирующего действия кальмодулина. Предельная величина константы активации ФДЭ кальмодулином (K_0) составляет 120 нМ. С учетом константы активации в отсутствие ингибитора (K_a), равной 2 нМ, степень ингибирующего действия $\beta 1$ -тимозина на фермент (K_0/K_a) близка к 60. Следовательно, конкуренция $\beta 1$ -тимозина за центр связывания с кальмодулином на

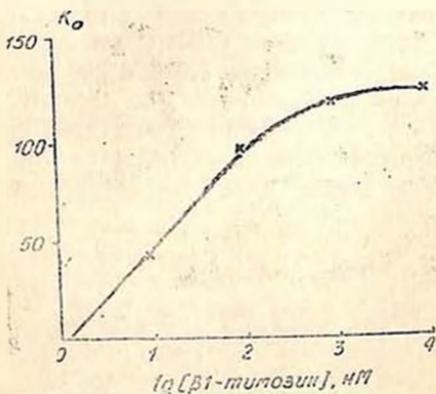


Рис. 6. График зависимости эффективной константы активации ФДЭ кальмодулином от концентрации $\beta 1$ -тимозина. Величины константы активации получены на основании данных, представленных на рис. 5 в двойных обратных координатах.

поверхности фермента невозможна, поскольку выполняются одновременно два следующих условия: ингибирующее действие $\beta 1$ -тимозина, направленное на увеличение K_a , является не полным и в отсутствие кальмодулина $\beta 1$ -тимозин не влияет на активность фермента во всем диапазоне представленных его концентраций. Поэтому можно говорить о наличии на поверхности молекулы кальмодулина центров, способных связывать $\beta 1$ -тимозин. Внутримолекулярная связь подобных центров направлена на ингибирование способности кальмодулина связываться с ФДЭ циклических нуклеотидов. О взаимодействии $\beta 1$ -тимозина с кальмодулином уже упоминалось [13], однако авторы предположили, что образование сложного комплекса связано с ферментативной активностью кальмодулин-синтетазы. Очевидно, что в свете представленных в настоящей работе данных такое объяснение недостаточно, поскольку они свидетельствуют о возможности спонтанного образования комплекса без участия вышеуказанной ферментативной реакции.

Таким образом, $\beta 1$ -тимозин следует рассматривать не только как белок, являющийся своеобразным маркером для протенназ, но как возможный внутриклеточный антагонист кальмодулина.

THE ROLE OF β 1-THYMOSIN IN THE REGULATION OF CALCIUM
AND CALMODULIN SENSITIVE PROCESSES (REGULATION
OF PHOSPHODIESTERASE ACTIVITY)

GALOYAN A. A., CHAILYAN S. G., ABRAHAMIAN G. E.

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

Using an affinity high performance liquid chromatography method with zonal elution from PDE-Biosphere and CaM-Biosphere columns it was demonstrated that β 1-thymosin in the presence of Ca^{2+} and Mg^{2+} ions is able to be irreversibly coupled to calmodulin. This effect was accompanied by the inhibition of calmodulin-stimulated PDE activity. The 60-fold increase of the constant for PDE activation by calmodulin was accompanied by a significant rise in the maximal rate of cAMP hydrolysis. The Hill coefficient ($n_H=3$) pointed out to the cooperative binding of the β 1-thymosin to the calmodulin.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Malenichik D. A., Anderson S. R. *Biochemistry*, v. 21, p. 3480—3486, 1982.
2. Weiss B., Prozialeck W. C., Wa'latz T. L. *Biochem. Pharmacol.*, v. 31, p. 2217—2226, 1982.
3. Hidaka H., Yamaki T., Totsuka T., Asano H. *Mol. Pharmacol.*, v. 15, p. 49—53, 1979.
4. La Porte D. C., Wierman B. M., Storn D. R. *Biochemistry*, v. 19, p. 3814—3819, 1980.
5. Atwin B. B., Keiter C. H., Storn D. R. *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Res.* (eds. S. I. Strada, W. J. Thompson), v. 16, p. 227—243, Raven Press, N. Y., 1984.
6. Rodbell M. J. *J. Biol. Chem.*, v. 250, p. 5826—5834, 1975.
7. Manahan A. S., Klee C. D. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, v. 80, p. 4231—4235, 1983.
8. Galoyan A. A. *Neurochem. Research*, v. 11, № 6, p. 769—787, 1986.
9. Galoyan A. A., Bobrusrin I. D., Gurovits B. Ya., Abrahamian G. E. *Neurochem. Res.*, v. 8, № 1, p. 78—86, 1989.
10. Abrahamian G. E., Kirakosova A. S., Isajanyan K. A., Galoyan A. A. *Neurochem. Research*, 1991, (в печати).
11. Thompson W. J., Appelman M. M. *Biochemistry*, v. 10, p. 311—316, 1971.
12. Галоян А. А., Чаилян С. Г., Абрамян Г. Э., Исаджаниян М. А., Киракосова А. С. *Нейрохимия*, т. 10, № 3—4, с. 140—145, 1991.
13. Ziegenhagen R., Goldberg M., Kabutt W. D., Jennissen H. P. *FEBS*, v. 271, № 1 2, p. 71—85, 1990.

Поступила 12.XII.1991

УДК 577.152.311

ОЧИСТКА КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМОЙ ФДЭ ЦИКЛИЧЕСКИХ
НУКЛЕОТИДОВ ГИПОТАЛАМУСА МЕТОДОМ АФФИННОЙ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИАБРАМЯН Г. Э., ИСАДЖАНЫАН М. А., ЧАИЛЯН С. Г., КИРАКОСОВА А. С.,
ГАЛОЯН А. А.

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

В настоящей работе предложен метод очистки кальмодулинзависимой ФДЭ циклических нуклеотидов, основанный на аффинной ВЭЖХ с использованием тандемной системы колонок, где в качестве неподвижной фазы применялся иммобилизованный на силикагеле кальмодулин. В сравнении с традиционными методами хроматографии на колонке CaM-Sepharos предложенный метод позволяет при комнатной температуре существенно уменьшить время проводимых процедур и достичь очистки фермента в гомогенном состоянии с высокой степенью активности.

ФДЭ циклических нуклеотидов обладают видовой и тканевой специфичностью. В мозгу млекопитающих этот фермент представлен несколькими изоформами, одна из которых—Ca²⁺-кальмодулинзависимая ФДЭ—является преобладающей (более 90% активности) и существующей в нескольких формах, различных по своим физико-химическим свойствам [1, 2]. Согласно современным представлениям о механизме регуляции кальмодулином активности ФДЭ, гидрофобному взаимодействию фермента с регулятором при увеличении внутриклеточного уровня содержания ионов Ca отводятся роль основного фактора, определяющего действие кальмодулина на активность ФДЭ [3].

Многие лаборатории, занимающиеся изучением кальмодулин-активируемой ФДЭ мозга [4—7], сталкиваются с определенными трудностями при очистке и идентификации этого фермента от других кальмодулинзависимых ферментов, в частности от протенинфосфатазы—кальцинейрина [8]. Поскольку эти белки обладают весьма схожими ионными, гидрофобными и гидродинамическими свойствами, традиционные методы хроматографии, в частности аффинной хроматографии на матрицах с иммобилизованным кальмодулином, становятся малоэффективными. В этой связи 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.

Нами предпринята попытка иного подхода к обсуждаемой проблеме и предложен метод, основанный на разнице сродства ФДЭ и кальцинефрина к кальмодулину.

Материалы и методы

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

Эксперименты проводили на двухкомпонентной системе ВЭЖХ «Biochrom BT:8100» (Германия), оснащенной инжектором «Rheodyne» с петлей для образца объемом 1 мл и детектором с изменяемой длиной волны. Спектральный диапазон дейтериевой лампы 190—370 нм. Все растворы постоянно дегазировали гелием для предупреждения образования пузырьков в системе. Для регистрации результатов хроматографии использовали систему хранения и поиска данных, включающую компьютер «IBM PC/AT 286» (США). Для аффинной ВЭЖХ использовали колонки Si-300 CaM-Biosphere (7,5×80 мм) и одно-разовый концентрирующий патрон cAMP-Biosphere «Bioservis» (Армения).

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson, Appleton [9] с применением меченого δ [³H]cAMP или δ [³H]cGMP. Инкубационная смесь (200 мкл) содержала 50 мМ трис-HCl, pH 7,0, 10 мМ MgCl₂, 2 мМ CaCl₂ или 2 мМ ЭГТА, 100 кБк δ [³H]cAMP или δ [³H]cGMP, 5 мМ β -меркаптоэтанол и 5 мкМ cAMP. Реакцию запускали 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 *Orpheophagus Nanna*. Реакцию, катализируемую этим ферментом, проводили при 30° в течение 10 мин. Сорбцию негидролизованного субстрата осуществляли на ионообменнике 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 (гидролиз субстрата—%·мкМ/мкл·мин).

Ниже представлено подробное описание методики очистки ФДЭ, схематическая диаграмма которой приведена на рис. 1.

Измельченную ткань гипоталамуса (100 г), хранившуюся при температуре -70° , гомогенизировали 3—5 мин в 300 мл буферного раствора А (25 мМ трис-НСl, рН—7,0, содержащего 2 мМ $MgCl_2$, 1 мМ азонд натрия, 1%-ный раствор антипенной эмульсии и 1 мМ фенил-метил-сульфонил-фторид при 4° на гомогенизаторе «Политрон». Гомогенат центрифугировали в течение 60 мин при 24000 г,

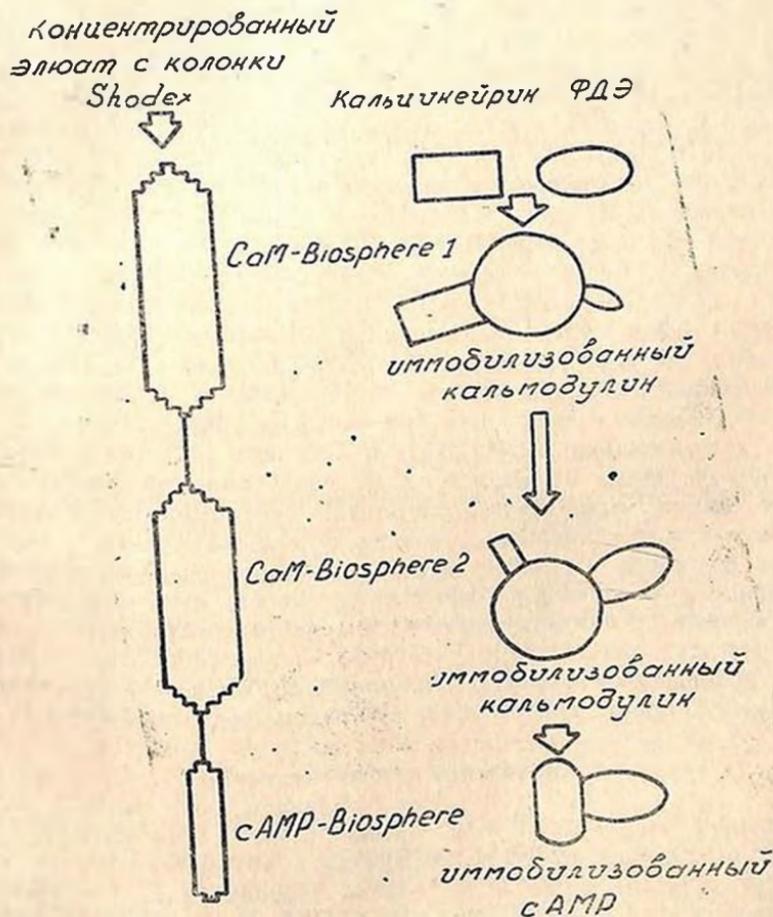


Рис. 1. Схематическая диаграмма очистки кальмодулинстимулируемой ФДЭ гипоталамуса методом аффинной ВЭЖХ на tandemной системе колонок CaM-Biosphere

(«Beckman G-21» ротор JA-14, США). В супернатант добавляли $CaCl_2$ в конечной концентрации 2 мМ и наносили на колонку Phenyl-Sepharose (15×20 мм), предварительно уравновешенную буфером В, содержащим 0,2 М NaCl. Скорость элюции 3 мл/мин. ФДЭ элюировали буфером В с добавлением 0,2 мМ ЭГТА. Скорость элюции 2 мл/мин. Контроль осуществляли по изменению оптической плотно-

сти (λ 280 нм) и фосфодиэстеразной активности. Все операции проводили при 4° жидкостным хроматографом — умеренного давления «Кнауер» (Германия).

Элюат с Phenyl-Sepharose, обладающий наибольшей ферментативной активностью (30 мл), концентрировали с ультрафильтратором «Amicon» (США) на мембране РМ-30 (Pellicon membrane 30000). Давление в ячейке поддерживали на уровне 3,5 атм при 0°.

1 мл наносили на tandemную систему последовательно соединенных аффинных колонок Si-100 CaM-Biosphere (8×75 мм) и Si-300 CaM-Biosphere (8×75 мм), предварительно уравновешенных 0,1 М фосфатным буфером С, рН 7,0, содержащим 0,5 М сульфат аммония, 2 мМ CaCl₂, 0,1 мМ ЭГТА и 10%-ный раствор глицерина. Колонки промывали тем же буфером, после чего первую колонку отсоединяли и регенерировали. Колонку 2 промывали пятью объемами буфера С, содержащего 0,1% раствор Brij 35 и дополнительно десятью объемами буфера С. Через инжектор на колонку наносили 1 мл буфера D, (0,1 М Na-фосфат, рН—7,0, содержащего 5 мМ MgCl₂, 5 мМ ЭГТА, 0,5 М сульфата аммония и 20%-ный раствор глицерина, после чего останавливали поток. Элюцию ФДЭ с колонки 2 на однократный концентрирующий патрон cAMP-Biosphere осуществляли через 20 мин в режиме линейного градиента сульфата аммония от 0,5 до 0 М в присутствии 2 мМ ЭГТА и 20%-ного раствора глицерина при скорости потока 0,8 мл/мин за 60 мин. Концентрирующий однократный патрон отсоединяли и хранили при температуре —20° в 40%-ном растворе глицерина в течение двух недель. За это время активность фермента и степень активации существенно не менялись.

Аффинные колонки CaM-Biosphere регенерировали после каждой хроматографии следующим образом: колонки промывали пятью объемами буфера регенерации F (50 мМ натрий-ацетатный буфер, рН 4,5, содержащий 0,5 М NaCl, 10 мМ ЭДТА и 6 М мочевины) с последующей промывкой десятью объемами воды и буфера С.

Результаты и обсуждение

Для препаративной очистки и идентификации ФДЭ из различных источников часто используют аффинную хроматографию на CaM-Sepharose [10—13]. Подобный подход универсален и, несмотря на ряд существенных недостатков, отмеченных выше, обладает значительными разрешающими способностями. С появлением ВЭЖХ замена обычных матриц на колонки с несравненно высоким разрешением позволяет значительно повысить эффективность хроматографии. Однако непосредственное нанесение супернатанта гомогената на такие колонки технически затруднено, и возникает необходимость в предварительной очистке грубой фракции фермента. Для этого весьма успешным оказывается гидрофобная хроматография на Phenyl-Sepharose. основанная на комбинации двух методик, предложенных ранее [14—16].

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, расположенных, по всей видимости, непосредственно на поверхности кальмодулина либо на индуцированной области на поверхности ФДЭ за счет Ca^{2+} -зависимой ассоциации фермента с кальмодулином. При потере ионов Ca^{2+} под действием хелатирующего агента происходят изменения в гидрофобных свойствах фермента, приводящие к быстрой потере способности ФДЭ связываться с фенильной матрицей. Таким образом, эксперименты, прове-

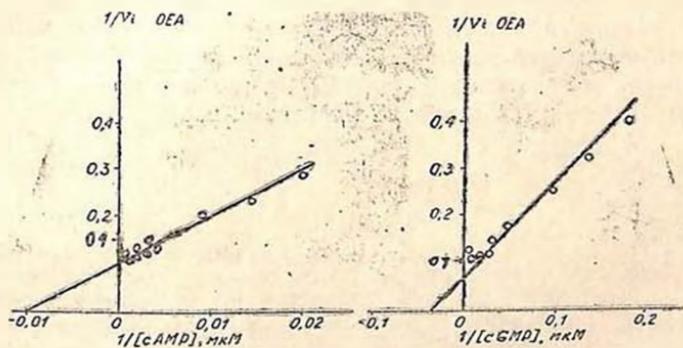


Рис. 2. Зависимость активности кальмодулинстимулируемой ФДЭ от концентрации субстратов сАМР (а) и сГМР (б) в двойных обратных координатах и отсутствие (1) и в присутствии 1-мкМ кальмодулина

денные с использованием гидрофобных фенильных матриц, показали, что с переводом очистки ФДЭ на фенильных матрицах в условиях ВЭЖХ можно достичь 30-кратной очистки фермента, позволяющей использовать на следующей стадии выделения ФДЭ ВЭЖХ на аффинной колонке СаМ-Biosphere.

Аффинная ВЭЖХ на тандемной системе колонок СаМ-Biosphere основана на способности кальмодулинзависимых белков конкурентно связываться с неподвижной фазой, где в качестве иммобилизованного лиганда выступает кальмодулин. После очистки ФДЭ методом гидрофобной ВЭЖХ в зоне ферментативной активности, соответствующем белковому пик ФДЭ, наблюдались значительные примеси другого кальмодулинсвязывающего белка—кальцинейрина (более 30%). Нанесение элюата с гидрофобной колонки на тандемную систему аффинных ВЭЖХ колонок СаМ-Biosphere позволяет кальцинейрину связываться с первой колонкой. При этом в профиле элюции наблюдалось лишь 15% фосфодиэстеразной активности. Связывание же основной массы ФДЭ происходит на второй колонке вследствие конкурентного взаимодействия двух белков с иммобилизованным ли-

гандом. ЭГТА-зависимой элюцией в одноразовый концентрирующий патрон сAMP-Biosphere достигалась 5000-кратная очистка ФДЭ до гомогенного состояния, о чем свидетельствовали данные электрофореза в ПААГ и гельпроникающей ВЭЖХ на колонке TSK SW-3000.

Специфическая активность ФДЭ гипоталамуса для субстрата сGMP при концентрации 0,5 мкМ составляла приблизительно 10—20 мкмоль/мин/мг белка, а в условиях насыщающих концентраций субстрата максимальная активность составляла 30—60 мкмоль/мин/мг для сGMP и 100—130 мкмоль/мин/мг для сAMP. На всем диапазоне исследуемых концентраций сAMP (от 1 до 500 мкМ) в координатах Лайнуивера-Бэрка фермент характеризовала линейная кинетика. Величина K_m равна 100 мкМ (рис. 2, а). При использовании в качестве субстрата сGMP (1—500 мкМ) прямолинейности не наблюдалось. Данные позволяют определить по крайней мере два значения K_m для сGMP, меньшее из которых (K_{m1}) в первом приближении равно 25 мкМ (рис. 2, б).

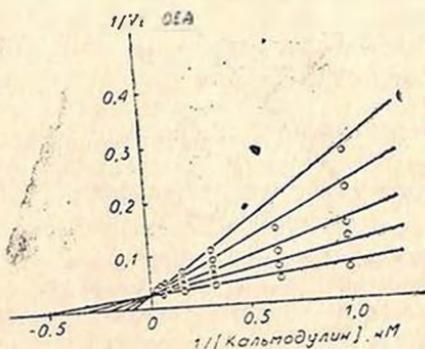


Рис. 3. График зависимости начальной скорости гидролиза сAMP от концентрации кальмодулина в присутствии фиксированных концентраций трифторперазина разных (в мкМ): 1—0, 2—1, 3—10, 4—100, 5—500 в двойных обратных координатах. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ ЭГТА при концентрации сAMP 5 мкМ

Микромолярные концентрации кальмодулина в присутствии ионов Ca (2 мМ) увеличивали скорость гидролиза 5 мкМ сAMP в 15—20 раз, максимальная активация ФДЭ достигалась при 1—5 мкМ кальмодулина, а кажущаяся константа активации была близка 2—2,5 нМ. Стимуляция фермента кальмодулином сопровождалась без существенного изменения K_m для сAMP при одновременном увеличении максимальной скорости гидролиза. В присутствии кальмодулина фосфатидилсерин обратимо стимулировал гидролиз сAMP; при этом наблюдался аддитивный эффект в модуляции активности фермента.

K_d комплекса Ca^{2+} -кальмодулин—ФДЭ, равная 2 нМ, существенно увеличивалась в присутствии антагониста кальмодулина, известного нейролептика трифторперазина, свидетельствуя о конкурентном типе ингибирования при образовании комплекса активатор—фермент (рис. 3).

Величина M_r субъединицы ФДЭ гипоталамуса, согласно данным электрофореза в ПААГ в присутствии ДДС-Na, составляла 61 кД (рис. 4, а). Данные гельпроникающей ВЭЖХ (рис. 4, б) свидетельствуют о том, что кажущаяся величина M_r ФДЭ, соответствующая

пика активности фермента на профиле элюции, лежит в области приблизительно 120 кД, что позволяет предположить о димерной организации молекулы ФДЭ с идентичными субъединицами в нативном состоянии.

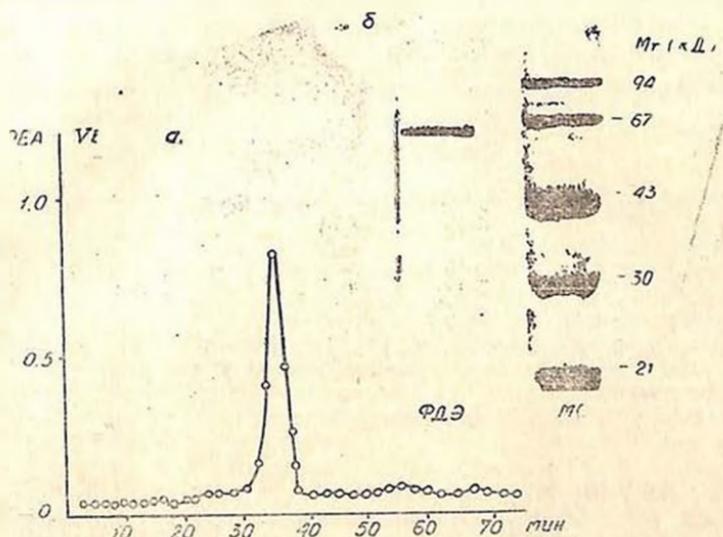


Рис. 1. Гельпроникающая ВЭЖХ на колонке TSK SW-3000 (а) (4,6×650 мм) и электрофорез в ПААГ в присутствии ДДС-Na (б) элюата с одноразового концентрирующего патрона cAMP-Biosphere.

Таким образом, сопоставляя вышеназложенные результаты с таковыми для традиционных аффинных методов хроматографии, а также с имеющимися на сегодняшний день литературными данными относительно выделения ФДЭ на матрицах с иммобилизованным кальмодулином, становится очевидным, что с переводом аффинной хроматографии в систему ВЭЖХ и заменой обычных матриц на колонки с несравнимо высоким разрешением позволяет значительно повысить эффективность выделения высокоактивного препарата ФДЭ в гомогенином состоянии.

PURIFICATION OF BOVINE HYPOTHALAMUS CALMODULIN STIMULATED PHOSPHODIESTERASE BY AFFINITY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

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

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

An affinity high performance liquid chromatographic method has been developed to separate calcium and calmodulin stimulated cyclic nucleo-

tide phosphodiesterase from bovine hypothalamus. The method employs a selective, EGTA-dependent elution with ammonium sulfate gradient from silicabased gel to which calmodulin bound. Comparing to traditional chromatography on CaM-Sepharose, the method proposed is more rapid, dilutes the sample to a small degree, achieves better resolution of kinetically distinct forms and is appropriate both for analytical and preparative use.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Kakiuchi S., Yamasaki R. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 41, p. 1104—1113, 1970.
2. Beavo J. A., Hansen R. S., Harrison S. A., Hurvitz R. L., Aurtins T. J., Munby M. C. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 28, p. 387—399, 1982.
3. Huang C. Y., Chau V. E., Chock P. B. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 78, p. 871—882, 1981.
4. Klee C. B., Crouch N. H., Krieks M. H. *Biochemistry*, v. 18, p. 722—731, 1979.
5. Merrill E. E., Thompson S. T., Stellwagen E. A. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 4371—4383, 1979.
6. Sharma R. K., Wang T. H., Wirch E. R., Wang J. H. *J. Biol. Chem.*, v. 255, p. 5916—5928, 1980.
7. Kincaid R. L., Vanganiello V. S., Vaughen M. D. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 11345—11357, 1981.
8. Kincaid R. L., Vaughen V. A. *Methods in Enzymology*, v. 159, p. 557—573, 1988.
9. Thompson W. J., Appleman M. M. *Biochemistry*, v. 10, p. 311—316, 1971.
10. Klee T. H., Krieks M. H. *Biochemistry*, v. 17, p. 120—131, 1978.
11. Watterson D. M., Vazavva T. C. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 73, p. 40—52, 1976.
12. Kincaid R. L., Vaughen M. *Biochemistry*, v. 22, p. 826—835, 1983.
13. Drasta G., Klee K. B. *Methods of Enzymology*, v. 159, p. 573—584, 1988.
14. Gopalokrishna R., Anderson W. B. *J. Biol. Chem.*, v. 258, № 4, p. 2405—2409, 1983.
15. Бобрускин Н. Д., Шайхин С. И., Муратова Н. В., Баранова Л. А., Северин С. Е. *Биохимия*, т. 52, № 8, с. 1344—1351, 1987.
16. Абрамян Г. Э., Чалян С. Г., Исаджян М. А., Киракосова А. С., Галоян А. А. *Нейрохимия*, т. 10, № 3—4, с. 140—145, 1991.

Поступила 20.XII.1991

ОЧИСТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НОВОГО БЕЛКА
ФЛАВОПРОТЕИДНОЙ ПРИРОДЫ
ИЗ ХРОМАФФИНЫХ ГРАНУЛПЕТРОСЯН С. А., БОЯДУЖЯН А. С., КАРАГЕЗЯН К. Г.,
АВАКЯН С. А., АБРАМОВ Р. Е.

Институт экспериментальной биологии АН Армении

Сообщается об обнаружении в хромаффинных гранулах электронного переносителя флавопротеидной природы. Описан метод очистки, позволяющий получать этот белок в электрофоретически гомогенном состоянии; определены его основные физико-химические свойства. Исследовано взаимодействие флавопротеида с рядом окислителей и восстановителей. Показано, что *in vitro* флавопротеид способен переносить электроны на цитохром b_{561} из мембран гранул.

Хромаффинные гранулы (ХГ) — специфические субклеточные образования, осуществляющие процессы накопления, хранения и высвобождения катехоламинов и локализованные в основном в мозговом слое надпочечников и окончаниях адренергических нейронов центральной и симпатической нервных систем [1, 2]. В мембранах ХГ был обнаружен ряд белков, способных к участию в окислительно-восстановительных реакциях — цитохром b_{561} , кислый медьсодержащий белок (КМБ), мембранная форма дофамин- β -монооксигеназы (м-ДБМ) и NADH: (акцептор) редуктаза [1—3]. Основываясь на этих данных, мы высказали предположение о наличии в мембранах ХГ цепи переноса электронов. Несмотря на достаточное количество экспериментальных данных и различных гипотез относительно порядка расположения компонентов, природы конечного акцептора и функций этой цепи [4, 5], эти вопросы на сегодняшний день остаются в числе нерешенных.

Нами был обнаружен еще один возможный компонент цепи переноса электронов ХГ — флавопротеид (ФП). Описан метод очистки, позволяющий получить этот белок в электрофоретически гомогенном состоянии; определены его основные физико-химические свойства и сравнены со свойствами соответствующих микросомных и митохондриальных аналогов. Исследовано взаимодействие ФП с рядом окислителей и восстановителей. Показано, что *in vitro* ФП способен переносить электроны на цитохром b_{561} . Ранее нами было установлено, что КМБ может принимать электроны от цитохрома b_{561} и переносить их на м-ДБМ, функционируя в качестве донора электронов в реакциях, катализируемых этим ферментом [6, 7]. Таким образом, при-

нимаемая во внимание представленные в данной работе и ранее полученные нами результаты, мы предполагаем, что обнаруженный нами ФП может являться одним из компонентов цепи переноса электронов ХГ, конечным акцептором которой является ДБМ; цепь включает следующую последовательность электронных переносчиков: ФП—цитохром b_{561} -МКМБ-МДБМ.

Материалы и методы

ХГ из мозгового слоя надпочечников крупного рогатого скота получали модификацией метода Hoffmann и соавт. [8]. Чистоту ХГ контролировали электронно-микроскопическим способом. Кроме того, нами была определена активность цитохромоксидазы—маркерного фермента мембран митохондрий. Активность цитохромоксидазы определяли ранее описанным методом [9]. Гранулы суспендировали в 1,5 мМ K^+ , Na^+ -фосфатном буфере, рН 6,5, содержащем 1%-ный NaCl и гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера. Лизис проводили трехкратным замораживанием суспензии и последующим размораживанием. Концентрация суспензии составляла 10% (вес/объем). Лизат центрифугировали при 4000 g, в течение 2-х ч, после чего осадок суспендировали в 1/4 части начального объема буфера и снова центрифугировали при тех же условиях. Суммарный надосадочный раствор был далее использован как источник для получения ФП. При отсутствии в буфере 1%-ного NaCl экстракция ФП практически не происходила. В процессе очистки был использован 10 мМ K^+ , Na^+ -фосфатный буфер, рН 6,5. Выход ФП на всех стадиях очистки регистрировали по наличию характерной для данного белка желтой окраски.

Белок определяли по методу Lowry, используя БСА в качестве стандарта [10]. Цитохром b_{561} , мембранные формы КМБ и ДБМ получали ранее описанным методом [11, 12].

Содержание углеводов в препаратах ФП определяли модификацией метода Zacharius, Zell [13]: о наличии углеводов судили по розовой окраске, появляющейся в зафиксированном в геле белке после окисления его 1%-ной йодной кислотой и взаимодействия с реактивом Шиффа. NADH и NADPH: (акцептор) редуктазную активность ФП определяли спектрофотометрически [14] в 50 мМ K^+ -фосфатном буфере, рН 7,6, используя в качестве акцепторов электроноферрицианид, метиленовый синий, КМБ (окисленный) и цитохром b_{561} (окисленный).

При изучении донорно-акцепторных специфичностей ФП, окисление или восстановление соответствующих белковых препаратов проводили инкубацией (в течение 10 мин при комнатной температуре с 10-кратным молярным избытком окислителя или восстановителя, избыток которых удаляли гель-фильтрацией на колонке с сефадексом G-25. Величину M_r определяли гель-фильтрацией на сефадексе G-100 [15], а также электрофорезом (ЭФ) в 7,5% полиакриламидном геле (ПААГ) с 0,1%-ным ДДС-Na препаратов белка, пред-

варительно инкубированных в течение 2-х ч при 38° в присутствии 2%-ного ДДС-Na или 2%-ного ДДС-Na и 5%-ного β-меркаптоэтанолола [16]. В качестве электродного буфера использовали Na⁺-фосфатный буфер, pH 7,0. Нулевой объем колонки определяли по объему выхода декстрана синего (2000 кД). При калибровке колонки и гелей были использованы следующие белки-маркеры: РНКаза (13,7 кД), лактальбумин (14,2 кД), трипсиноген (24 кД), химотрипсиноген (25 кД), глицеральдегидтрифосфат-дегидрогеназа (36 кД), овальбумин (43 кД), БСА (66 кД), β-галактозидаза (116 кД), альдолаза (158 кД), каталаза (232 кД), тиреоглобулин (669 кД). Гели окрашивали Кумасси синим. В качестве низкомолекулярного маркера использовали бромфеноловый синий.

О гомогенности белковых препаратов судили по наличию одиночного пика в элюционной диаграмме, построенной по поглощению при 280 нм, в ходе гель-фильтрации белка через колонку с сефадексом G-100 и по наличию одной белковой полосы при ЭФ в 7,5%-ном ПААГ, pH 8,9 по методу Davis [17]. В качестве электродного буфера использовали трис-глициновый буфер, pH 8,3.

Качественную и количественную идентификацию простетической группы ФП проводили двумя независимыми методами: 1—методом флуоресцентного анализа, основанным на значительном различии зависимости флуоресценции флавинаденидинуклеотидов (ФАД) и флавимононуклеотидов (ФМН) от pH среды [18]; 2—спектрофотометрическим анализом и ТСХ отделенного от белковой части флавина. ФП (0,6 мг в 1 мл) инкубировали в присутствии 3 мМ ЭДТА при 100° в течение 3 мин. В этих условиях нековалентно связанный флавин отделяется от белковой части молекулы [18, 19]. После инкубации смесь, содержащую апобелок и флавиновый компонент, подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 и собирали желтую фракцию, соответствующую флавину. Концентрацию флавина определяли, исходя из величины коэффициента молярной экстинкции полосы при 450 нм ($E_{450} = 11,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). ТСХ проводили в системе бутанол-уксусная кислота—H₂O (12:3:5) [19] на силиколовых пластинках с силикагелем типа «Silpearl». В обоих методах в качестве стандартов были использованы ФАД и ФМН.

При подготовке к аминокислотному анализу препараты ФП (0,5 мг) подвергали гидролизу 6 М HCl под азотом в вакуумных гидролизных ампулах в течение 24, 48 и 72 ч при 110°. После лиофилизации гидролизаты растворяли в 0,2 М Na-цитратном буфере, pH 2,2. Содержание триптофана и SH-группы определяли ранее описанными методами [20, 21].

Получение экстрактов для выявления наличия фосфо-, глико- и нейтральных липидов в препаратах ФП (0,9 мг) проводили по методу Bligh и Dugг [22]. Идентификацию качественного состава экстрактов осуществляли ТСХ на пластинках с силикагелем типа Н (10—40 мкм), используя для разделения следующие системы растворителей: хлороформ-уксусная кислота-вода (25:15:4:2)—для ФЛ, петroleйный

эфир-днэтиловый эфир-муравьиная кислота (60:40:2) — для нейтральных липидов и хлороформ-метанол-2,5 М аммиак (60:5:8) для ганглиозидов. Пластинки окрашивали в парах йода.

Оптические измерения проводили на спектрофотометре «Specord M-40» и флуорометре «MP₂-44A» («Perkin-Elmer», Швеция) аминокислотный анализ проводили на приборе «Т-339» («Microtechna», Чехословакия). Электронно-микроскопический анализ проводили на приборе «Тесла Б-413 А» (Чехословакия).

Результаты исследования

В табл. 1 представлены основные этапы очистки ФП. Надосадочный раствор, полученный после лизиса ХГ, диализовали 48 ч против 20 л 1,5 мМ К⁺, Na⁺-фосфатного буфера, содержащего 1%-ный NaCl, с 2-разовой сменой буфера через 24 ч, затем против 20 л 1,5 мМ буфера, 24 ч. После диализа раствор хроматографировали на колонке с ДЭАЭ-ц (2,5×2,6 см), уравновешенной буфером. Через колонку пропускали в среднем по 600 мл раствора (1,48 мг бел-

Таблица 1

Процедура очистки флавопротеида

Стадия	Объем, мл	Концентрация белка, (мг/мл)	A _{445,280}
Надосадочный раствор, полученный после центрифугирования лизата ХГ	1800	1,5	
Хроматография на ДЭАЭ-ц	330	0,8	0,05
Гель-фильтрация на сефадексе G-50	23	22,0	0,37
Гель-фильтрация на сефадексе G-100	0	0,77	0,62

Примечание. *—объем, полученный после концентрирования фракции.

ка в 1 мл), промывали ее порциями (по 200 мл) 10, 20, 30, 40, 50, 60 мМ NaCl в буфере и желтую фракцию, содержащую ФП, элюировали 100 мМ NaCl в буфере. Элюат подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-50, уравновешенным 200 мМ NaCl в буфере. Фракцию, выходящую в свободном объеме, подвергали гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-100, уравновешенным 200 мМ NaCl в буфере. Повторная гель-фильтрация полученной фракции, содержащей ФП, на колонке с сефадексом G-100 приводила к элюции ФП в виде одиночного пика (рис. 1): полученная фракция обнаруживала одну полосу при ЭФ в 7,5%-ном ПААГ (рис. 1). Выход ФП составлял 23 мг из 150 г пасты ХГ. В табл. 2 представлен аминокислотный состав полученного препарата ФП, в табл. 4—основные физико-химические свойства ФП в сравнении со свойствами ряда электронных переносчиков флавопротеидной природы. Согласно полученным данным, обнаруженный нами ФП представляет собой гликопротеид. Качественный анализ липидов в экстрактах ФП показал от-

существование в молекуле белка ФЛ, нейтральных липидов и ганглиозидов. Величина M_r ФП по данным гель-фильтрации, составляет 123 кД. При ЭФ в ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-На препараты ФП, обработанные 2%-ным ДДС-На, мигрируют в виде двух полос, подвижность которых соответствует M_r 53 и 87 кД (рис. 2). Таким образом, в состав молекулы белка входят две нековалентносвязанные

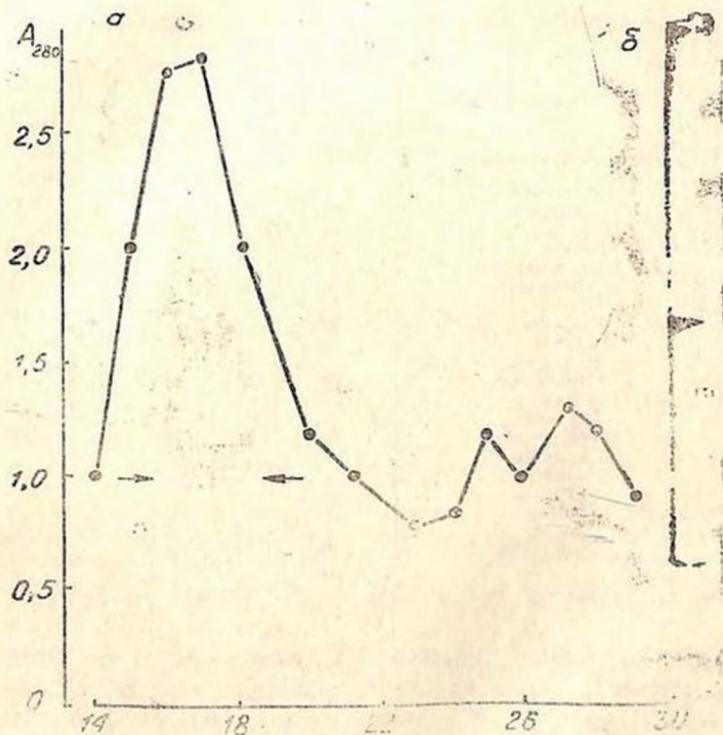


Рис. 1. а. Диаграмма элюции флавопротеинов (ФП) на колонке с сорбентом G-100. Размеры колонки—2,3×48 см, нулевой объем—84 мл. Элюцию проводили 200 мл NaCl в 10 мМ K^+ , Na^+ -фосфатном буфере, pH 6,6. Объем каждой фракции составляет 5 мл. По оси абсциссы указаны номера фракций. б. Электрофореграмма нативного ФП. Гель окрашен Кумаси синим

субъединицы. Величина M_r ФП, определенная при суммировании молекулярных масс субъединиц, составляет 140 кД. При ЭФ препаратов ФП, обработанных 2%-ным ДДС-На и 5%-ным β -меркаптоэтанолом, подвижность более высокомолекулярной субъединицы возрастает, принимая значение 76 кД (рис. 2). По-видимому, данная субъединица включает в свой состав небольшой полипептидный фрагмент, связанный с остальной частью молекулы дисульфидным

мостиком, который невозможно идентифицировать при окраске гелей. Величина M_r ФП, определенная на основании аминокислотного анализа (табл. 2) с учетом наличия двух молекул ФАД на молекулу белка (см. далее), составляет 115 кД. Согласно данным аминокислотного анализа, 27% молекулы белка составляют кислые аминокислоты; 35% — гидрофобные.

Таблица 2

Аминокислотный состав флавопротеида из хромофитных гранул

Аминокислота	Количество остатков на молекулу	
	экспериментальное значение	интегральное значение
Аспарагиновая кислота	92,8	93
Треонин	44,2	44
Серин	32,0	32
Глутаминовая кислота	118,2	118
Пролин	31,0	31
Глицин	48,2	48
Аланин	61,2	61
Метионин	0	0
Изолейцин	18,0	18
Лейцин	78,4	78
Тирозин	0,3	0
Фенилаланин	32,8	33
Гистидин	28,2	28
Лизин	98,0	98
Аргинин	32,2	32
Валин	49,8	50
Цистин	2,5	3
Триптофан	39,0	39

Примечание. Приведенные значения соответствуют данным 72 ч гидролиза.

Гель-фильтрация препаратов ФП, обработанных 3 мМ ЭДТА при 100° в течение 3 мин, приводила к отделению характерной для флавина желтой фракции от белковой части молекулы. ТСХ показала, что эта фракция представляет собой ФАД. Эти данные подтвердились при сравнении спектров оптического поглощения полученной фракции в УФ и видимой области со спектрами стандартных растворов ФАД и ФМН. Содержание ФАД в препаратах ФП, рассчитанное с учетом концентраций белка (использованного для денатурации) и ФАД (отделенного от белка), составляло 2 молекулы на одну молекулу ФП. Концентрацию ФАД рассчитывали на основе значения оптической плотности и коэффициента молярной экстинкции полосы при 450 нм. Аналогичные данные получены при использовании метода флуоресцентного анализа, позволяющего осуществлять как качественную, так и количественную идентификацию нековалентно-связанного с белком флавина.

Основные максимумы поглощения полученного препарата ФП (рис. 3, а) в видимой области оптического спектра приходятся на 360

и 445 нм, обнаруживается плечо при 410 нм, препараты имеют желтую окраску. Добавление к ФП метиленового синего не приводило к возрастанию интенсивности отмеченных полос, что свидетельствует о его полностью окисленном состоянии. В табл. 3 представлены данные, полученные при изучении донорно-акцепторных специфичностей ФП. Как следует из представленных данных, в числе неприродных восстановителей и окислителей эффективными оказались дитионит и

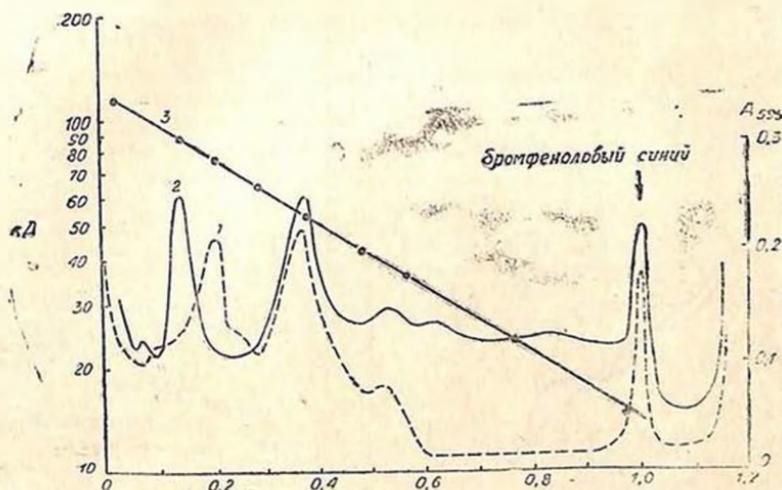


Рис. 2 Денситограммы гелей, полученных при электрофорезе флавопротеидов (ФП) в 7,5% -ном ПААГ с 0,1%-ным ДДС-На (1, 2) и стандартная кривая для определения M_r ФП, построенная с использованием белков-маркеров (3). Препараты ФП обрабатывали 2%-ным ДДС-На (2) и 2%-ным ДДС-На с 5%-ным β -меркаптоэтанолом (1); препараты белков-маркеров—2%-ным ДДС-На с 5%-ным β -меркаптоэтанолом. Справа налево: лактальбумин, трипсиноген, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа, овальбумин, ФП (53 кД), БСА, ФП (76 кД), ФП (87 кД), β -галактозидаза. Гели окрашивали Кумасси синим. По оси абсцисс—относительная подвижность, по оси ординат—величина M_r в кД (3)

метиленовый синий, соответственно; восстановленный препарат ФП бесцветен. Многократное чередование стадий окисления и восстановления не приводило к инактивации ФП. ФП окислялся молекулярным кислородом: инкубация восстановленного белка в течение 24 ч при комнатной температуре приводила к его полному окислению. В числе природных окислителей нами был идентифицирован цитохром b_{561} из мембран ХГ (рис. 3, б).

Обсуждение результатов

Из представленных в табл. 4 данных следует, что обнаруженный нами в ХГ ФП по своим физико-химическим свойствам не соответствует ни NADH: (акцептор) редуктазе ХГ, ни переносчикам электронов флавопротеидной природы микросом и митохондрий. Послед-

ний факт свидетельствует о том, что наличие ФП не является следствием загрязнения препаратов ХГ другими органеллами. Об этом же свидетельствуют тесты на чистоту ХГ: электронно-микроскопический анализ не обнаруживает в препаратах ХГ лизосом или митохондрий; активность маркерного фермента мембран митохондрий—цитохром-оксидазы составляет 5% от исходной его активности в гомогенатах мозгового слоя надпочечников. Кроме того, выход ФП (23 мг из 150 г ХГ; 0,02% от общего веса ХГ) достаточно высокий, для того

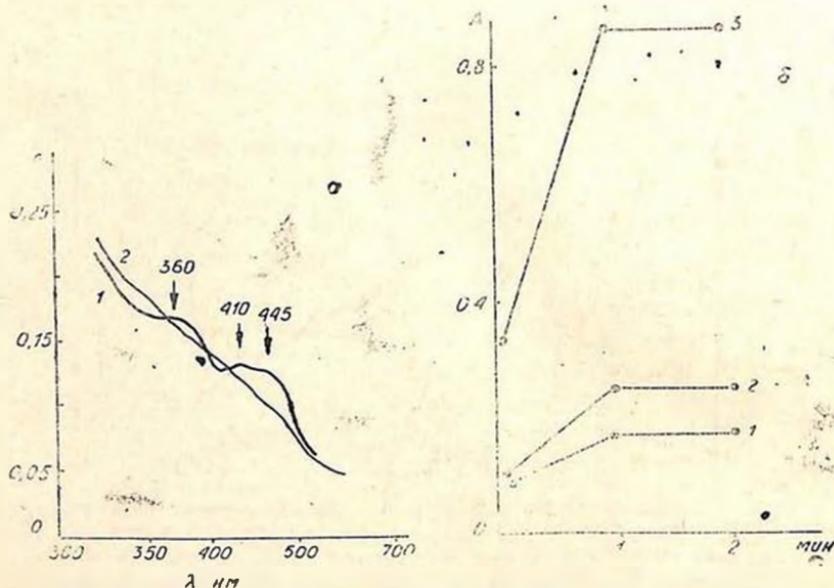


Рис. 3, а. Оптические спектры флавопротеида (ФП) в видимой области. 1—спектр исходного препарата, 2—спектр препарата, восстановленного дитионитом. Концентрация ФП составляла 3,9 мг в мл. Спектр регистрировали в 10 мМ K^+ , Na^+ -фосфатном буфере, рН 6,6. б. Кинетика восстановления цитохрома b_{561} (1, 3) и окисления ФП (2). Концентрация цитохрома b_{561} составляла 1,3 и 6 мг/мл (2); концентрация ФП—1,9 (1, 3) и 3,9 (2). При регистрации кинетик в области 561 (1) и 427 нм (3) нулевой фон (контрольная кювета) устанавливали по ФП; в области 445 нм (2)—по цитохрому b_{561} . Кинетики регистрировали в 10 мМ K^+ , Na^+ -фосфатном буфере, рН 7,5

чтобы предположить, что наличие этого белка в ХГ является следствием присутствия в их препаратах других органелл. Так, для сравнения, выход ДБМ (мембранной и растворимой форм вместе взятых) из 1 кг мозгового слоя надпочечников (приблизительно 100 г ХГ) составляет 60 мг—0,06% от общего веса ХГ, а этот белок является основным компонентом мембранных белков ХГ [23].

Выделенный нами из ХГ белок имеет характерный для ФП спектр оптического поглощения в видимой области (рис. 3, а), и, как показано двумя независимыми методами, содержит 2 молекулы ФАД на

одну молекулу белка с M_r 123—140 кД. Спектр ФП, представленный на рис. 3, а, состоит из трех полос, что типично для ряда ФП. Предполагают, что в подобных случаях для флавина характерно гидрофобное окружение с незначительным количеством водородных мостиков [24]. Нельзя также исключить возможность наличия в препаратах обнаруженного нами ФП двух типов ФАД, различающихся по своему микроокружению. Кроме того, известно, что присутствие, помимо ФАД, его модифицированных форм (6-ОН-ФАД; 8-ОН-ФАД) может приводить к появлению дополнительного максимума в видимой об-

Таблица 3

Воздействие окислителей и восстановителей
на флавопротеиды из хромаффинных гранул

Окислитель	Эффект	Восстановитель	Эффект
Феррицианид	—	Ферроцианид	—
Метиленовый синий	+	Дитионит	+
Кислый медьсодержащий белок (КМБ), окисленная форма	—	КМБ, восстановленная форма	—
Дофамин- β -монооксигеназа (ДБМ), окисленная форма	—	Цитохром b_{561} , восстановленная форма	—
Цитохром b_{561} , окисленная форма	+	Цитохром c_1 , восстановленная форма	—
Цитохром c_1 , окисленная форма	—	Адреналин	—
Молекулярный кислород	+	Дофамин	—
		Норадреналин	—
		НАОН, НАОНН	—
		Аскорбат	—
		Глутатион	—
		ДБМ, восстановленная форма	—

Примечание. Восстановление препаратов КМБ, ДБМ и цитохромов b_{561} и c_1 с помощью аскорбата и дитионитом, соответственно, окисление—феррицианидом. Условия окисления и восстановления описаны в «Материалах и методах».

ласти оптического спектра [25]. Данные по определению M_r ФП двумя независимыми методами (ЭФ в присутствии ДДС-Na, гель-фильтрация) находятся в хорошем соответствии. Более низкое значение величины M_r , рассчитанное исходя из аминокислотного анализа, по сравнению с данными, полученными с помощью вышеотмеченных методов, можно объяснить наличием в молекуле белка углеводов.

Как уже было отмечено, в предыдущих исследованиях нами была показана возможность переноса электронов от цитохрома b_{561} к ДБМ через КМБ [7]. С другой стороны, в настоящем исследовании установлено, что ФП *in vitro* может выполнять роль донора электронов цитохрома b_{561} (рис. 3, б). Таким образом, основываясь на ранее полученных данных и результатах, представленных в настоящей работе, можно с достаточной степенью вероятности предположить, что обнаруженный нами ФП и другие вышеотмеченные переносчики электронов мембран ХГ являются компонентами единой цепи переноса электронов, функционируя в следующей последовательности:

—ФП—цитохром b_{561} —КМБ—ДБМ.

Поиски природного восстановителя ФП среди компонентов ХГ

Таблица 4

Сравнение основных физико-химических параметров ряда электронных переносчиков флавопротендной природы

	Флавопротеиды из хромаффинных гранул (ХГ)	NADH-редуктаза мембран ХГ	NADH-дегидроге- наза митохондрий	NADPH цито- хром P ₄₅₀ редук- таза микросом	NADH: цитохром b ₅ редуктаза ми- кросом
Mt (кД)	123—130	105.0	70.0	79.0	43.0
Число субъединиц	2	2	1	1	1
Mt субъединиц кД	67,6; 63,0	55.0	70.0	78.0	43,0
Простетическая группа	2 ФАД	не установлено	1 ФН	1 ФАД 1 ФМН	1 ФАД
Наличие углеводов	+	не установлено	не установлено	+	—
Основные максимумы опти- ческого поглощения в видимой области спектра (окисленная форма), nm	360, 445, 410	не идентифици- рованы	370, 450	340, 450, 476	390, 461, 490
Природные доноры элект- тронов	не установлены	NADH	NADH	NADPH	NADH
Природные акцепторы электронов	цитохром b ₅₅₁	не установлены	Fe S белок	цитохром P ₄₅₀	цитохром b ₅
Связь с мембраной	не установлена	интегральная трансмембранная	интегральная	интегральная	интегральная
Литература	настоящая работа	15	16	27	23

(табл. 3), а также ряда других природных соединений не увенчались успехом. В отличие от большинства электронных переносчиков флавопротеидной природы, ФП не оказался способным к окислению NADH и NADPH. Таким образом, остаются открытыми вопросы о природе начального донора цепи переноса электронов мембран ХГ и ее биологической роли.

THE PURIFICATION OF A NEW FLAVOPROTEIN FROM CHROMAFFIN GRANULES AND INVESTIGATION OF ITS PROPERTIES

PETROSIAN S. A., BOYAJYAN A. S., KARAGEOSIAN K. G., AVAKIAN S. A.,
AERAMOV R. E.

Institute of Experimental Biology of Academy of Science of Armenia

The discovery of electron carrier of flavoprotein nature in chromaffin is reported. The purification procedure presented allows to isolated this protein in electrophoretically homogeneous form. The main physico-chemical properties of the flavoprotein have been determined. The interaction of flavoprotein with a number of oxidants and reducers has been investigated. The flavoprotein has been shown to reveals in vitro an ability to transfer electrons from the membranes of chromaffin granules to cytochrome b_{561} .

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Winkler H., Westead E. Neuroscience, v. 5, № 11, p. 1809-1823, 1986.
2. Winkler H., Apps D. K., Fisher-Gotbrie R. Neuroscience, v. 18, № 2, p. 261-290, 1986.
3. Mikaelyan M. V., Grigoryan N. F., Na'bandyan R. M. 12th International Congress of Biochemistry, Perth, Australia, 15-21 August, p. 326, 1982.
4. Wakefield L. M., Cass A. E. G., Radda G. K. J. Biol. Chem., v. 26, № 21, p. 9746-9752, 1986.
5. Kent U. M., Fleming P. J. J. Biol. Chem., v. 262, № 17, p. 8174-8178, 1987.
6. Petrosyan S. A., Hovanesyan L. L., Boyajyan A. S., Karageuzyan K. G. 8th general meeting "European Society for neurochemistry", Leipzig, GDR, 23-28, July, p. 98, 1990.
7. Оганесян Л. Л., Бояджян А. С., Петросян С. А., Карагеузян К. Г. Молекуляр. биол., т. 25, № 1, с. 99-104, 1991.
8. Hoffman P. G., Zinder O., Bonner W. M., Pollard H. B. Arch. Biochem. and Biophys., v. 176, № 1, p. 375-388, 1976.
9. Smith L. Methods in Enzymology, v. 2, p. 732, 1955.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265-275, 1951.
11. Петросян С. А., Оганесян Л. Л., Арутюнян М. Г., Бояджян А. С., Карагеузян К. Г. Тезисы III республиканской конф. «Достижения физико-химической биологии и биотехнологии и пути их внедрения» РА, Ереван, 16-17 октября, с. 69, 1989.
12. Бояджян А. С., Набандян Р. М., Буятыян Г. Х. Биохимия, т. 46, № 4, с. 635-640, 1981.
13. Zacharius R., Zell T. Anal. Biochem., v. 30, № 1, p. 148-152, 1969.
14. Terland O., Flatmark T. Biochim. et biophys. acta, v. 305, № 2, p. 206-218, 1973.

15. *Andrews P.* Biochem. J., v. 51, № 2, p. 222—233, 1964
16. *Weber K., Osborn M.* J. Biol. Chem., v. 214, № 16, p. 4405—4412, 1969.
17. *Davis B. J.* Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, № 3, p. 404—42, 1964
18. *Faeder E. J., Siegal L. M.* Anal. Biochem., v. 53, № 1, p. 332—336, 1973.
19. *Gomes B., Fendrich G., Abeles R. H.* Biochemistry, v. 20, № 5, p. 1451—1490, 1981.
20. *Edelhoc H.* Biochemistry, v. 6, № 7, p. 1918—1924, 1967.
21. *Habeeb A. F. S.* Anal. Biochem., v. 56, № 1, p. 60—65, 1973
22. *Bligh E. G., Dyer W. J.* Can. J. Biochem. Physiol., v. 37, № 8, p. 911—97, 1959.
23. *Ljones T., Skotland T., Flatmark T.* Eur. J. Biochem., v. 61, № 2, p. 525—533, 1976.
24. *Lederer F.* Eur. J. Biochem., v. 88, № 2, p. 425—431, 1978.
25. *Ghista S., Mayhew S. G.* J. Biol. Chem., v. 248, № 25, p. 6538—6540, 1973.
26. *Zaremba S., Hogue-Angeletti R.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 219, № 2, p. 297—305, 1982.
27. *De Pierre J. W., Ernster L.* Ann. Rev. Biochem., v. 46, № 1, p. 211—262, 1977.
28. *French J. S., Guengerich F. P.* J. Biol. Chem., v. 255, № 9, p. 4112—4119, 1980.
29. *Mihara K., Sato R.* J. Biochem., v. 78, № 5, p. 1057—1073, 1975.

Поступила 25. VII 1991

С 6 по 9 марта 1994 г. в Цюрихе состоится III Европейский симпозиум по кальций-связывающим белкам в нормальных и трансформированных клетках („Third European Symposium on Calcium Binding Proteins in Normal and Transformed Cells“, Zurich, Switzerland, March 6—9, 1994).

Желающим принять участие в работе симпозиума обращаться по адресу:

Symposium Secretariat
 Dr. C. W. Heizmann
 University Children's Hospital
 Div. of Clinical Chemistry
 Steinwiesstrasse 75
 CH—8032 Zurich
 Switzerland

УДК 577.152.277:612.8.015.

ЭНДОГЕННОЕ ADP-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ ОСТАТКОВ
ЦИСТЕИНА И ГИСТИДИНА В БЕЛКАХ
СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

МОИСЕСЯН Н. О., БУРНАЗЯН Л. Б., АРУТЮНЯН А. В.

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

Установлено, что повышенные уровни ADP-рибозилирования в синаптических мембранах (СМ) мозга крыс сопровождается увеличением включения [^{14}C]ADP-рибозы в определенные, особенно высокомолекулярные, зоны белков (M_r 130—140 кД, 100—210 кД, 250 и 270 кД). При инкубации СМ, используемых в качестве источника ядерных ADP-рибозилтрансфераз, с меченым NAD и свободными аминокислотами (аргинин, цистеин и гистидин) последние образуют конъюгаты с [^{14}C] ADP-рибозой, о чем свидетельствуют данные по разделению продукта реакции на Dowex 1 \times 4. Предположение о том, что акцепторами аминокислотами в белках СМ, подвергающихся ADP-рибозилированию, могут быть, помимо аргинина, цистеина и гистидина, подтверждается в опытах с применением HgCl_2 , NH_2OH и NaOH , селективно разрушающих определенные ADP-рибоза-аминокислотные связи.

В настоящее время установлено, что процесс ADP-рибозилирования в нервной ткани осуществляется при участии нескольких ферментов. К ним относятся ДНК-зависимая (ADP-рибоза)-полимераза, присутствующая преимущественно в ядерной фракции [1—3], митохондриальная и цитоплазматическая (ADP-рибозил)-трансфераза, катализирующая в отличие от (ADP-рибоза)-полимеразы присоединение ДНК-независимым путем нескольких ADP-рибозных остатков к акцентирующим белкам [4, 5] и моно-ADP-рибозилтрансфераза, специфическим образом модифицирующая остатки аргинина мембранных белков, в частности в синапсосомах [6—8].

Исследованиями Lester и соавт. [6] и Фоменко и соавт. [7] было доказано, что в лизированных СМ протекает аргининспецифическое моно-ADP-рибозилирование белков. Проведенные нами ранее эксперименты [8] показали, что при экспозиции СМ мозга крыс при комнатной температуре в течение 20 ч уровень ADP-рибозилирования в них резко возрастает. При этом процесс ингибируется не только в присутствии Met-аргинина, являющегося субстратом присутствующей в СМ моно-ADP-рибозилтрансферазы [6, 7], но также гистидина и цистеина. На основании этого нами было высказано предположение, что в мозгу могут функционировать ADP-рибозилтрансферазы, специ-

фические по отношению к этим аминокислотным остаткам в белках СМ [8].

Для выяснения этого вопроса были поставлены эксперименты, в которых исследовалась способность СМ осуществлять АDP-рибозилирование, наряду с аргинином, цистеином и гистидином.

Материалы и методы

Из коры больших полушарий беспородных крыс изолировали фракцию синапсом и после ее осмотического шока путем центрифугирования в градиенте сахарозы 1,2:1:0,8 М выделяли СМ [9], которые после 20 ч хранения при комнатной температуре или при 0° в присутствии ингибитора протеолиза фенилметилсульфонилфлуорид использовали в качестве источника АDP-рибозилтрансфераз. АDP-рибозилирование СМ осуществляли, как описано в предыдущей работе [8], но с использованием двойной метки NAD. Инкубационная смесь (0,35 мл) содержала по 42 пмоль [аденозин-¹⁴C]NAD и [никотинамид-³H]NAD («Amersham», Англия); 50 мМ трис-HCl буфер pH 7,0; 0,5 мМ ДТТ, 10 мМ тимидин и СМ (150 мкг белка). В качестве акцепторов меченой АDP-рибозы использовали цистеин, гистидин и метиловый эфир аргинина. Для разделения продуктов реакции АDP-рибозилирования пробы наносили на Dowex 1×4 или подвергали гель-фильтрации на сефадексе G-25 superfine [10, 11].

В опытах по определению природы химической связи АDP-рибоза-белок реакцию останавливали 100 мМ Перес-буфера pH 7,5, содержащего 2%-ный ДДС-Na. К реакционной смеси добавляли равный объем 1 М NaCl, NH₂OH, NaOH или 20 мМ HgCl₂ и инкубировали от 15 до 60 мин при 37°. После этого к пробам добавляли 20%-ную ТХУ, пропускали их через фильтры Millipore (толщина пор 0,65 мкм) и определяли количество метки, оставшейся связанной с белком [12].

Для выявления белков СМ, подвергающихся АDP-рибозилированию, исследовали включение радиоактивности в белки СМ после их 2 ч инкубации с [аденозин-¹⁴C]NAD, 100 пмоль (остальные компоненты инкубационной среды были те же, что приведены выше). После инкубации проводили электрофорез в присутствии 0,1%-ного ДДС-Na [13], гели разрезали на полоски по 3 мм, помещали их в 1%-ный раствор NH₄OH в пергидроле и затем определяли радиоактивность на счетчике SL-4221 («Intertechnique», Франция).

Результаты и обсуждение

Одной из возможных причин стимулирования процесса АDP-рибозилирования в СМ при хранении может быть их деструкция с высвобождением акцепторных белков, а также соответствующих мембраносвязанных АDP-рибозилтрансфераз. Проведенные исследования показали, что усиление АDP-рибозилирования в СМ, хранящихся в течение 20 ч при комнатной температуре в условиях ингибирования

протеклиза (при добавлении фенилметилсульфонилфлуорида), сопровождается увеличением включения метки в определенные зоны белков.

Как видно из данных, представленных на рис. 1, б, включение [^{14}C]ADP-рибозы в белки СМ, хранившиеся при 0° , очень незначительно, независимо от величины их M_r . Несколько интенсивнее, по сравнению с другими, метка включается в белок с $M_r \approx 45$ кД, что соответствует литературным данным, согласно которым в СМ мозга

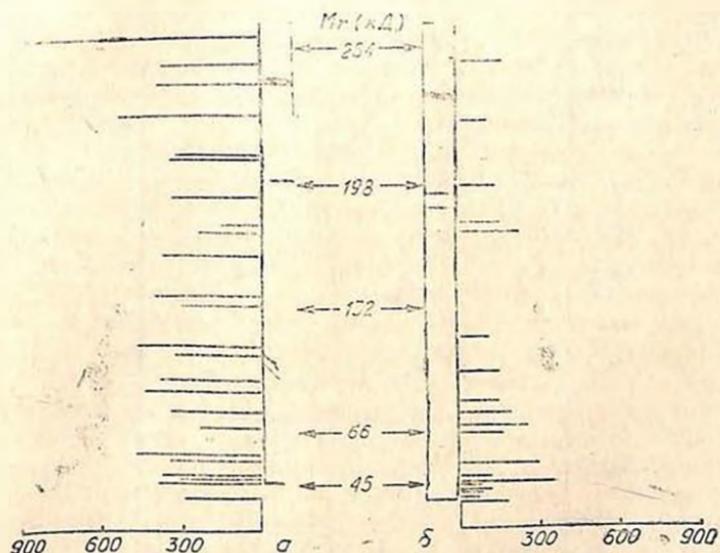


Рис. 1. Включение [^{14}C] ADP-рибозы (в расп/мин) в белки СМ, хранившиеся при 20° (а) и 0° (б) при их инкубации с [аденозин- ^{14}C] NAD. В качестве маркеров при определении M_r белков СМ использовали яичный альбумин

крыс происходит моно-ADP-рибозилирование белка с M_r 42 кД, относящегося к GTP-связывающим белкам аденилатциклазной системы [6, 7]. В СМ, хранившихся при 20° , наряду с усилением ADP-рибозилирования белков, в которые метка, хотя и слабо, включается и при 0° , происходит включение радиоактивности в высокомолекулярные зоны белков с M_r 130—150, 210—215, 250 и 270 кД. По данным Lester и соавт. [6], акцепторной аминокислотой в белках синапсом электрического органа *Torpedo* является аргинин, аналогичные результаты были получены при исследовании моно-ADP-рибозилирования в СМ мозга крыс [7].

Ранее нами было обнаружено, что процесс ADP-рибозилирования в СМ мозга крыс ингибируется, наряду с аргинином, также с гистидином, и, особенно, цистеином. Эти данные указывали на возможность того, что в СМ, помимо ADP-рибозилирования остатков аргинина в белках СМ, происходит перенос остатка ADP-рибозы с NAD

на другие акцепторные аминокислоты. Для подтверждения этого была поставлена специальная серия опытов, в которых СМ, используемые в качестве источника ADP-рибозилтрансфераз, инкубировали в присутствии радиоактивного NAD с двойной меткой и Met-аргинина, цистеина или гистидина (см. материалы и методы).

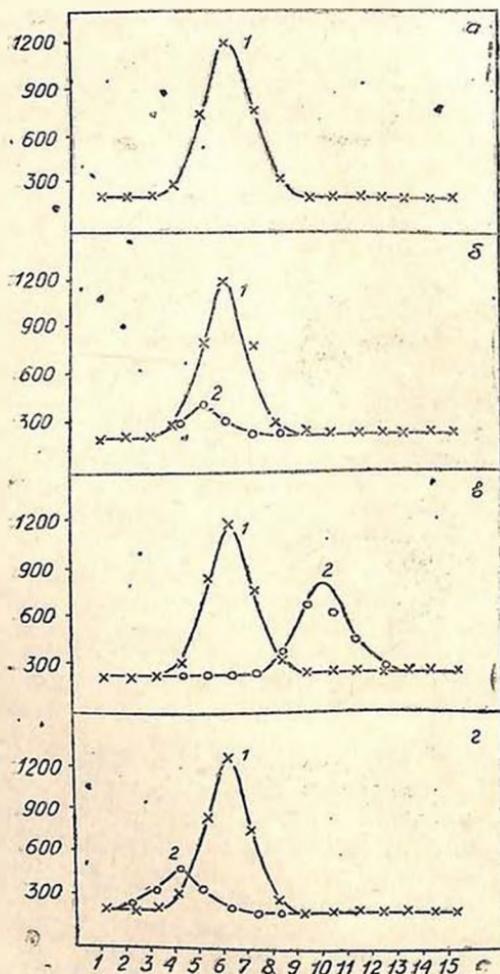


Рис. 2. Разделение на Dowex 1.4 (100—200 меш) продуктов реакции ADP-рибозилирования после инкубации СМ меченым NAD (смесь аденозин [^{14}C]NAD и никотинамид [^3H] NAD) и аминокислотами: а—контроль (без аминокислот); б—Met-аргинином; в—цистеином; г—гистидином. По оси абсцисс—объем элюиционного буфера (в мл), по оси ординат (в расп/мин): 1—включение [^3H] никотинамида, 2—включение [^{14}C]ADP-рибозы

Проведенные исследования показали, что при разделении на Dowex 1×4 проб, содержащих СМ и меченый NAD, обнаруживался лишь пик [³H]никотинамида (рис. 2, а), при добавлении же аминокислот, помимо него, выявлялась также метка [¹⁴C]ADP-рибозы. Эти данные наглядно свидетельствуют об образовании конъюгатов использованных нами аминокислот с меченой ADP-рибозой, отличающихся между собой профилем элюции (рис. 2, б-г). Следует также подчеркнуть, что наиболее эффективное включение метки [¹⁴C]ADP-рибозы наблюдалось при наличии в среде инакубации цистенна.

В последнее время появились данные, свидетельствующие о наличии цистенинспецифических тканевых моно-ADP-рибозилтрансфераз с механизмом действия, подобным коклюшному токсину [14—16]. Тапшта и соавт. [14] выделили из эритроцитов человека так называемую ADP-рибозилтрансферазу С, которая катализирует перенос ADP-рибозного остатка с [аденин-³H]NAD на метиловый эфир цистенна. Методом тонкослойной хроматографии удалось разделить образовавшийся продукт от меченых NAD и ADP-рибозы. Было показано также, что ADP-рибозилтрансфераза С катализирует и образование [¹⁴C]никотинамида из [карбонил-¹⁴C]NAD. S-бензил-цистенин, в котором SH-группы заблокированы, а также цистин не эффективны в реакции моно-ADP-рибозилирования, что свидетельствует о том, что ADP-рибоза присоединяется к SH-группам цистенна, хотя нельзя полностью исключить, что акцептирующим участком могут быть и его NH₂-группы. Последующими исследованиями японских авторов было установлено, что ADP-рибозилтрансфераза С из эритроцитов катализирует ADP-рибозилирование GTP-связывающих Gi-регуляторных белков [15]. Было обнаружено также эндогенное цистенинспецифическое ADP-рибозилирование белков в печени крыс. Исследования Jacobson и соавт. показали, что ADP-рибозилирование цистенна в кислотонерастворимой фракции печени крыс составляет 14,2 пмоль ADP-рибозы на мг белка, что несколько уступает уровню ADP-рибозилирования аргинина, равному 19,2 пмоль на мг белка [16]. Наряду с этим, были опубликованы данные о том, что тиогликозидная связь, в отличие от других гликозидных связей, специфическим образом разрушается в присутствии ионов ртути [16—18].

Полученные нами результаты также можно рассматривать с позиции наличия в синаптической фракции мозга ADP-рибозилтрансферазы, катализирующей перенос остатка ADP-рибозы на свободный цистенин с образованием ADP-рибозилцистенна. Это было подтверждено в опытах с обработкой СМ, подвергшихся ADP-рибозилированию, HgCl₂ (рис. 3).

Ингибирование включения метки в белки СМ при их инкубации с [аденозин ¹⁴C]NAD почти на 20% под влиянием HgCl₂ свидетельствует о наличии тиогликозидной связи. Из данных, представленных на рис. 3, видно также, что примерно такое же действие на уровень ADP-рибозилирования белков СМ оказывает 1 М NH₂OH, который в при-

меняемых нами условиях (60 мин обработки) не действует на тногликозидную связь и обладает относительной специфичностью по отношению к N-гликозидной связи, образуемой между остатками аргинина и ADP-рибозой [12, 19]. Оба типа гликозидной связи чувствительны к NaOH [20, 21], который, как было обнаружено нами значительно снижает уровень ADP-рибозилирования белков СМ (рис. 3). Однако обработка 1 М NaOH не приводит к полному исчезновению метки, около 40% ее остается, что свидетельствует о наличии других типов модифицированных аминокислотных остатков в белках СМ. К числу гликозидных связей, не распадающихся под влиянием NaOH, относится так называемый дифтаמיד [19, 22], представляющий собой амидированную форму гистидина, присутствующую в факторе элонгации 2 [22].

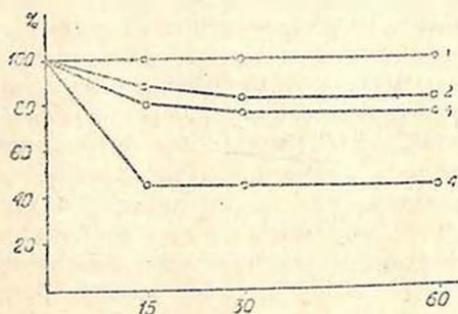


Рис. 3. Действие специфических реагентов на различные ADP-рибоза-аминокислотные связи, образующиеся в белках СМ при инкубации с [аденозин-¹⁴C] NAD в присутствии: 1—NaCl (контроль, 1 М), 2—HgCl₂ (20 мМ), 3—NH₂OH (1 М), 4—NaOH (1 М). По оси абсцисс — время инкубации (мин), по оси ординат — количество связанной с белком метки (%).

Обнаружено, что фактор элонгации 2, выделенный из почечной ткани хомячка и печени крупного рогатого скота, обладает дифтаמיד-специфической ADP-рибозилтрансферазной активностью и может подвергаться ауто-ADP-рибозилированию [23]. На основании приведенных нами данных нельзя исключить, что дифтаמיד или его предшественник гистидин служат мишенью эндогенного ADP-рибозилирования в СМ.

Резюмируя вышесказанное, можно предположить, что в головном мозгу крысы происходит ADP-рибозилирование остатков аргинина, цистеина, гистидина (дифтамида—?) белков СМ. Этот вывод основывается на фактах ингибирования этими аминокислотами процесса ADP-рибозилирования в СМ, образования меченых аддуктов при инкубации с ними меченого по аденозину и никотинамиду NAD и расщепления образующихся связей ADP-рибоза—белок в присутствии селективных в отношении различных аминокислотных остатков соединений. В пользу наличия в мозгу субстратов эндогенного ADP-рибозилирования с различными акцепторными аминокислотами (аргинин, цистеин) свидетельствуют исследования, в которых описаны мембранные, так называемые малые G-белки, подвергающиеся ADP-рибозилированию в присутствии бактериальных токсинов [24, 25]. Однако для окончательного суждения о природе аминокислотных ос-

татов, подвергающихся в мозговой ткани эндогенному ADP-рибозиллированию, необходимы дополнительные исследования, которые бы позволили охарактеризовать соответствующие ADP-рибозилтрансферазы.

ENDOGENOUS ADP-RIBOSYLATION OF CYSTEINE AND HISTIDINE RESIDUES OF SYNAPTIC MEMBRANE PROTEINS

MOVSESSIAN N. H., BURNASIAN L. B., HAROUTUNIAN A. V.

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

The incorporation of labeled ADP-ribose residues in the high molecular weight proteins (M_r 130–140 kD, 210–215 kD, 250 and 270 kD) of synaptic membranes of rat brain cerebral cortex have been established. The different types of ADP-ribose–amino acid bonds have been shown to be formed by endogenous ADP-ribosyltransferases of synaptic membranes. Arginine, cysteine and histidine were supposed as acceptor amino acids. The idea was confirmed in the experiments where $HgCl_2$, NH_2OH and $NaOH$ selectively destroyed appropriate ADP-ribose–amino acid bonds.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Завацкивиц Т. М., Маргулян Д. О., Тамазян А. С. Изв. АН ГССР, т. 6, № 2, с. 141–146, 1980.
2. Завацкивиц Т. М., Сабелашвили Д. Ш. Нейрохимия, т. 8, № 3, с. 385–389, 1989.
3. Арутюнян Д. Д., Погосян А. А., Мхитарян А. Г. ДАН АрмССР, т. 86, № 4, с. 178–180, 1988.
4. Masmodi A., Mandel P. J. Neurochem., v. 51, p. 188–193, 1988.
5. Chupre C., Maniez C., Mandel P. J. Neurochem., v. 51, № 2, p. 561–565, 1988.
6. Lester H. A., Steer L., Michaelson D. M. J. Neurochem., v. 38, № 4, p. 1030–1086, 1982.
7. Фоменко А. И., Халмуратов А. Г., Степаненко С. П., Пожарун С. В. Биол. мембраны, т. 3, № 2, с. 124–130, 1986.
8. Арутюнян А. В., Мовсесян Н. О., Бурназян Л. Б., Еранян С. С., Геворкян Г. А. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 500–508, 1988.
9. Abita J. P., Chicheptortiche R., Schweitz H., Lazdunski M. Biochemistry, v. 16, № 9, p. 1858–1864, 1977.
10. De Wolf M. J. S., Vitti P., Ambesi-Impombato F. S., Kohn L. D. J. Biol. Chem., v. 256, № 23, p. 12287–12296, 1981.
11. Moss J., Vaughan M. J. Biol. Chem., v. 252, p. 2455–2457, 1977.
12. Aktories K., Just I., Rosenthal W. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 156, № 1, p. 361–367, 1988.
13. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680–685, 1970.
14. Tanuma S., Kawashima K., Endo H. J. Biol. Chem., v. 101, p. 821–824, 1987.
15. Tanuma S., Kawashima K., Endo H. J. Biol. Chem., v. 263, № 11, p. 5483–5493, 1988.

16. Jacobson E. L., Mitgmuang M., Aboul-E'za N., Jacobson P. K. — In: ADP-Ribose Transfer Reactions, Mechanisms and Biological Significance (ed. by Jacobson E. L. and Jacobson M. K.), p. 13—17, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-N. Y., 1989.
17. Payne D. M., Jacobson E. L., Moss J., Jacobson M. K. *Pl. Chemistry*, v. 21, p. 7540—7549, 1989.
18. Meyer T., Koch R., Fanick W., Hitz H. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, v. 319, p. 579—583, 1988.
19. Pirson K. J., McMahon K. K. *Biochem. J.*, v. 270, p. 791—797, 1990.
20. Richter C. — In: ADP-Ribosylation of Proteins (ed. by Althaus P. R., and Richter C.), p. 216—230, Springer-Verlag, Berlin, 1988.
21. Sekine A., Fujiwara H., Naramiya S. J. *Biol. Chem.*, v. 264, p. 3602—3607, 1989.
22. Brown B. A., Bodley J. W. *FEBS Lett.*, v. 101, p. 251—254, 1979.
23. Lee H., Iglewski W. J. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 101, p. 291—270, 1984.
24. Ros M., Gonzalez-Galero G., Martin M., Chabero A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 171, № 2, p. 770—776, 1990.
25. Shinoda M., Katada T., Ui M. *Cell Signall.*, v. 2, № 4, p. 403—414, 1990.

Поступила 26.XII.1990

Neurocytochemical Methods. NATO ASI Series, (E) by A. Calic, D. Eugene), N 58, Springer-Verlag, Berlin, 1991, 335 p.

Нейроцитохимические методы. ASI серия НАТО, т. N 58 Изд. Springer-Verlag, Берлин, 1991, 335 с.

Книга «Нейрохимические методы» представляет исследователям, аспирантам, нейрологам и персоналу биологических лабораторий точное и подробное описание наиболее современных и действенных методов нейроцитохимии, позволяющих определять локализацию и совместное распределение нейротрансмиттеров, изучать их взаимодействие на клеточном и субклеточном уровне, производить гистологическое и ультраструктурное детектирование рецепторов, количественно определять медиаторы, выявлять нейроны, их отростки и проводить 3-D реконструкцию нейронов. Это руководство включает цитофункциональные подходы к описанию аксонального транспорта, методологию изучения экспрессии генов и физиологических эффектов нейротрансмиттеров (РЕТ, ионо- и электрочувствительные красители). Особое внимание уделяется возможностям, ограничениям, техническим сложностям и путям применения описанных методик, равно как и их возможному сочетанию при изучении одних и тех же образцов тканей.

УДК 612.82+577.15

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛЕКТИНА LPM₁ С Ca²⁺, Mg²⁺-АТРАЗой
МИКРОСОМ ГОЛОВНОГО МОЗГА

КОНОРДИЗЕ Н. Н., АДАМИА М. Ю., АЛЕКСИДЗЕ Н. Г., РАПАВА Э. А.

Тбилисский государственный университет

Показано, что лектин LPM₁ из грузинского сорта фасоли оказывает стимулирующее влияние на активность Ca²⁺, Mg²⁺-АТРАЗы микросом головного мозга крыс и актомиозина мышц лягушки. Стимулирующий эффект в большей степени проявляется при концентрации Ca²⁺ 1,5 мМ и рН 7,4—7,8, то есть при таких условиях, когда максимально проявляется лиганд-рецепторное взаимодействие. Методом агглютинации трихенизированных кроличьих эритроцитов установлено связывание лектина с актомиозином и фракцией микросом.

Данные кинетического анализа о влиянии лектина на Ca²⁺, Mg²⁺-АТРАЗную активность показали, что лектин имеет специфический центр связывания и отличается по месту локализации от активного центра фермента.

Изменение распределения кальция в нервной ткани имеет важное значение в проявлении функции нервных клеток [1]. Транспорт ионов кальция осуществляется клеточными каналами и активным транспортом с участием Ca²⁺, Mg²⁺-АТРАЗы мембран, среди которых особое место занимает микросомная Ca²⁺, Mg²⁺-АТРАза, наиболее близкая по своим физико-химическим показателям к Ca²⁺, Mg²⁺-АТРАзе саркоплазматического ретикулума [2].

Из данных литературы известно, что ряд АТРАЗ проявляет чувствительность к растительным лектинам [3—5], оказывая стимулирующее влияние на транспорт Ca²⁺ [6—8]. При этом отсутствуют указания о влиянии лектинов на энергетическое обеспечение активного транспорта кальция с участием Ca²⁺, Mg²⁺-АТРАЗы микросом мозга. Исходя из вышесказанного, мы предприняли исследование по изучению влияния ранее выделенного нами лектина LPM₁ из семян грузинского сорта фасоли [9] на Ca²⁺, Mg²⁺-АТРАЗную активность микросом головного мозга крыс и актомиозина мышц лягушки.

Материалы и методы

Микросомную фракцию головного мозга белых беспородных крыс получали по методу Skou [10]. Исследовали активность транспортной Ca²⁺, Mg²⁺-АТРАЗы [11] и по разности активностей суммарной

Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы и Mg^{2+} -АТФазы рассчитывали Ca^{2+} -АТФазную активность. Исследования проводили в инкубационной среде, содержащей в конечной концентрации (в мМ): CaCl —1, MgCl —2,5, АТФ—2,5, трис- HCl —40 (рН—7,7).

Растительный лектин LPM_{40-80} , характеризующийся высокой магглютинирующей и митогенной активностями, выделяли из семян грузинского сорта фисоли (*Phaseolus vulgaris* L. var. *oblongo-ovatus* subvar. *ochrolepis*; *vinoso-variegatus* A. Kob) по описанной ранее методике [9].

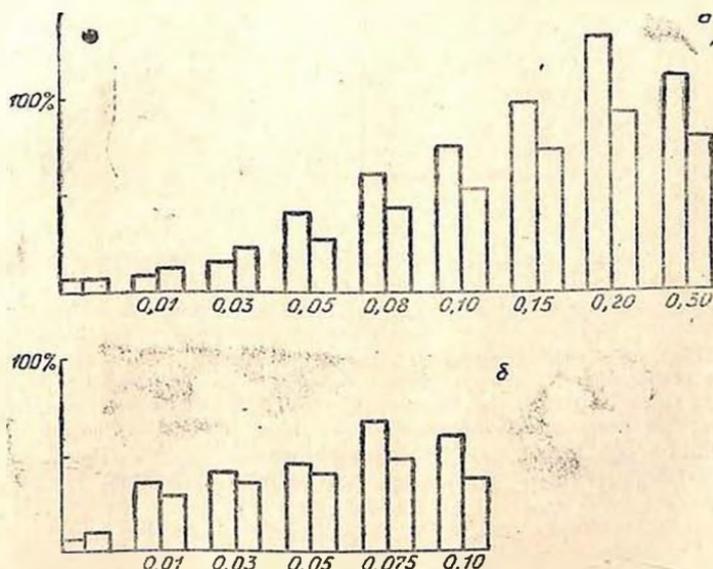
Результаты и обсуждение

В первой серии опытов исследовали влияние лектина LPM_{40-80} на Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФазные активности микросомной фракции головного мозга крысы в зависимости от его концентрации.

Установлено, что лектин LPM_{40-80} стимулирует Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФазные активности в строгой зависимости от его концентрации. При низких концентрациях препарата (0,01 мг/мл—0,03 мг/мл) в большей степени обнаруживается активирование Mg^{2+} -АТФазы, а при высоких концентрациях (0,05 мг/мл—0,20 мг/мл) Ca^{2+} -АТФазы. Активность ферментов при концентрации лектина 0,2 мг/мл возрастает соответственно на 90 и 130% по отношению к контролю, принятому за 100% (рис. 1, а).

Стимулирующий эффект лектина LPM_{40-80} на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазу микросом можно объяснить, с одной стороны, связыванием лектина с рецепторами мембран микросом и последующим изменением их структурной организации, с другой—непосредственным связыванием лектина с ферментом. С целью выяснения данного вопроса мы исследовали влияние LPM_{40-80} на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазную активность ферментного препарата актомиозина из мышц лягушки (рис. 1, б) и установили, что аналогично данным, полученным на микросомах, лектин LPM_{40-80} также оказывает стимулирующее действие на активность актомиозиновой Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы, что служит основанием для объяснения последнего взаимодействия лектина с рецепторами белковой молекулы фермента. При этом не исключена возможность повышения активности фермента и путем конформационных перестроек мембран микросом, одним из доказательств которого, по-видимому, может послужить факт усиления активностей Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы микросом при повышении концентрации лектина, когда создаются условия для индуцированной перестройки организации рецепторов и фермента в мембране, способствующие оптимизации лиганд (лектин)-рецепторного взаимодействия. Экспериментальным подтверждением этого предположения явились опыты с агглютинацией кроличьих трипсилизированных эритроцитов, проведенной до и после предварительной инкубации лектина с актомиозином (табл. 1) и микросомной фракцией (табл. 2).

Показано, что как актомиозин, так и микросомная фракция сами по себе не вызывают гемагглютинации трипсилизированных кроличьих эритроцитов (табл. 1, Е, табл. 2, Е), подавляя тем не менее лектиновую активность LPM_{10-80} в зависимости от концентрации примененных факторов. Торможение активности лектина при титрации его



1 2

Рис. 1. а—Влияние разных концентраций лектина LPM_{10-80} на Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФазную активность микросомальной фракции головного мозга белых крыс. Активность фермента выражена в % по отношению к контролю, принятому за 100%. 1— Ca^{2+} -АТФаза, 2— Mg^{2+} -АТФаза. По оси абсцисс—концентрация лектина в мг/мл. б—Влияние разных концентраций лектина LPM_{10-80} на Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФазные активности актомиозина мышц лягушки. Активность выражена в % по отношению к контролю, принятому за 100%. 1— Ca^{2+} -АТФаза, 2— Mg^{2+} -АТФаза. По оси абсцисс—концентрация лектина в мг/мл.

раствора на фоне постоянной концентрации актомиозина и микросомной фракции проявляется с конца титрационных лунок планшета (табл. 1, В; 2, В). При титрации же актомиозина и микросом в условиях постоянной концентрации лектина, напротив, подавление агглютинации обнаруживается лишь в начальной стадии титрации (табл. 1, С; табл. 2).

Имея в виду важное значение концентрации Ca^{2+} и водородных ионов в связывании лектина с рецепторами [7, 8, 12], мы провели специальные исследования по изучению LPM_{10-80} на Ca^{2+} -, Mg^{2+} -АТФазную активность в зависимости от наличия в среде инкубации разных концентраций Ca^{2+} и водородных ионов (рис. 2).

Из рис. 2 видно, что Ca^{2+} -АТРазная активность в условиях оптимальной концентрации лектина LPM_{10-80} (0,20 мг/мл) достигает своего максимума при концентрации Ca^{2+} 1,5 мМ, являющейся оптимальной и для лектин-рецепторного взаимодействия.

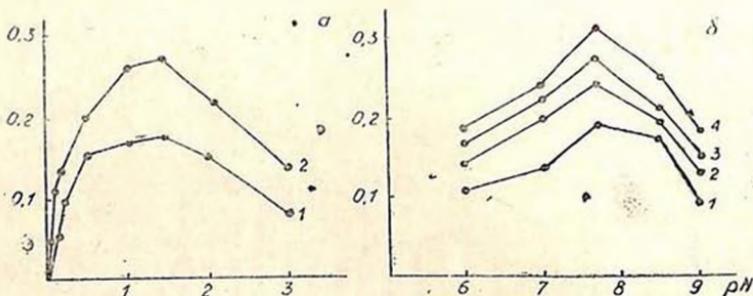


Рис. 2. а—Влияние лектина на Ca^{2+} -АТРазию активность в зависимости от концентрации Ca^{2+} . Концентрация лектина—0,2 мг/мл. 1— Ca^{2+} -АТРаза, 2— Ca^{2+} -АТРаза+лектин. По оси абсцисс концентрация Ca^{2+} в мМ. По оси ординат—активность фермента в мкМ Pi /мг белка/мин. б—Влияние лектина LPM_{10-80} (0,2 мг/мл) на Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТРазию активность микросомальной фракции головного мозга белых крыс в зависимости от pH. 1— Mg^{2+} -АТРаза, 2— Mg^{2+} -АТРаза+лектин, 3— Ca^{2+} -АТРаза, 4— Ca^{2+} -АТРаза+лектин. По оси ординат—активность фермента в мкМ Pi/мг белка/мин

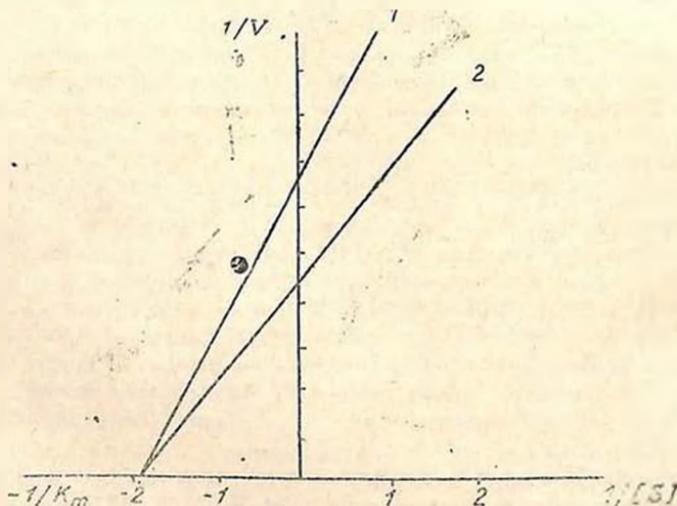


Рис. 3. Кинетическая характеристика влияния лектина LPM_{10-80} на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРазию активность микросомальной фракции головного мозга крыс. 1— Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза, 2— Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТРаза+лектин. По оси абсцисс—обратная величина концентрации субстрата— 10^{-3} М.

Аналогичная закономерность была прослежена и в отношении реакции инкубационной среды (рис. 2, а). Максимальный стимулирующий эффект лектина на Ca^{2+} - и Mg^{2+} -АТФазные активности проявляется в пределах рН 7,4—7,8, то есть при концентрации водородных ионов, являющейся оптимальной и для связывания лектина с соответствующими рецепторами. Таким образом, выясняется, что эффект лектина LPM_{10-10} на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазную активность осуществляется посредством его связывания с ферментным препаратом актомиозина и микросом.

Таблица 1

Влияние актомиозина мышцы лягушки на гемагглютинирующую активность лектина LPM_{10-10} трисенсибилизированных кроличьих эритроцитов (ТКЭ)

Варианты опытов	Нумерация ячеек планшета											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
В	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Д	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
Е	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. А—контроль (50 мкл ТКЭ+150 мкл агглютинирующий буфер); В—титруется лектин (20 мкг), концентрация актомиозина постоянна (115 мкг/200 мкл); С—титруется актомиозин (115 мкг), концентрация лектина постоянна (20 мкг/200 мкл); Д—титруется лектин (20 мкг)+ТКЭ (50 мкл/200 мкл); Е—титруется актомиозин (115 мкг)+ТКЭ (50 мкл/200 мкл); "+" и "—" отражают наличие и отсутствие эффекта агглютинации соответственно.

Таблица 2

Влияние белков микросомальной фракции головного мозга крыс на гемагглютинирующий эффект лектина LPM_{10-10}

Вариант опытов	Нумерация ячеек планшетов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
А	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
В	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
С	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+
Д	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—
Е	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Примечание. А—контроль (50 мкл ТКЭ+150 мкл агглютинирующий буфер); В—титруется лектин (20 мкг), концентрация микросом постоянна (300 мкг/200 мкл); С—титруется фракция микросом (300 мкг), концентрация лектина постоянна (20 мкг/200 мкл); Д—титруется лектин (20 мкг) + ТКЭ (50 мкл/200 мкл); Е—титруется фракция микросом (300 мкг)+ТКЭ (50 мкл/200 мкл); "+" и "—" наличие и отсутствие эффекта агглютинации соответственно.

С целью выяснения места связывания лектина с Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазой, ответственного за осуществление его модуляторной функции, был проведён кинетический анализ влияния лектина LPM_{10-80} на Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазную активность микросом (рис. 3). При этом удалось продемонстрировать, что присутствие лектина изменяет лишь величину V Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы, оставляя постоянной ($0,55 \cdot 10^{-3}$ М) величину K_m . Это послужило основанием для заключения, что связывание лектина происходит не в активном центре фермента, а за его пределами. Если принять во внимание структурное расположение Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы в мембранах [13], то более вероятным участком связывания, по всей вероятности, является рецепторная область интегрального белка микросом, что и вызывает структурную реорганизацию, способствующую усилению активности Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазы микросом.

INTERACTION OF LECTIN LPM_{10-80} WITH Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase OF RATS BRAIN MICROSOMES

KOSHORIDZE N. I., ADAMIA M. I., ALEKSIDZE N. G., RAPAVALA E. A.

Tbilisi State University

The stimulatory effect of lectin LPM_{10-80} (*Phaseolus vulgaris* L. var. oblongo-ovatus subvar ochroleucus vinoso-variegatus A. Kob) on Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity of rats brain microsomes and frog muscle actomyosin has been shown. This effect is intensively revealed at the 1.5 mM concentration of Ca^{2+} and pH 7,7—7,8, conditions that are optimal for the ligand-receptor interaction too. By the hemagglutination method the binding of lectin to microsome and actomyosin has been detected. The kinetic analysis of lectin LPM_{10-80} stimulatory effect on the Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase activity permitted to conclude that the Ca^{2+} , Mg^{2+} ATPase has a specific binding centre for lectins and it differs from the disposition of the enzyme active centre.

ЛИТЕРАТУРА

1. Carvalho A. P. Handbook of Neurochemistry, v. 1, p. 69—116, 1982.
2. De Meis L., Rubin Atschul B. M., Machado R. D. J. Biol. Chem., v. 245, p. 1883—1889, 1970.
3. Королев Н. П. Функции лектинов в клетке. Итоги науки и техники. М. т. 1, 1984.
4. Averdunk R., Günther T. Immunobiol., v. 157, p. 132—144, 1980.
5. Horejsi V., Chaloupecka O., Kocourek J. Biochim. et biophys. acta, v. 539, p. 287—293, 1978.
6. Allwood G., Asherson G., Davey J. Immunol., v. 21, p. 509—511, 1971.
7. Brown J., Hunt R. Int. Rev. Cytol., v. 52, p. 277—349, 1978.
8. Kay J. Exper. Cell. Res., v. 68, p. 11—16, 1971.

9. Рапава Э. А., Алексидзе Г. И., Кекенадзе Л. В., Алексидзе Н. Г. Сообщ. АН СССР, т. 134, с. 177—180, 1989.
10. Skou J. C. Biochim. et biophys. acta, v. 23, p. 394--399, 1957.
11. Fiske S., Subbarow J. J. Biol. Chem., v. 66, p. 375--380, 1925.
12. Луцки М. Д., Панасюк Е. И., Луцки А. Д. Лектины, Львов, «Вища школа», 1984.
13. Болдырев А. А., Мельгунов В. И. Транспортные АТФазы, Итоги науки и техники. Серия Биофизика, т. 17, М., 1985.

Поступила 12. III 1991

МДК 577.158

МОДИФИКАЦИЯ КАТАЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ МЕМБРАНОСВЯЗАННЫХ МОНОАМИНОКСИДАЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ ПЕРЕКИСНОМ ОКИСЛЕНИИ ЛИПИДОВ

МИЛВЕДЬ А. Е., РАПГОРОВСКАЯ Д. И., ГОРАНИ В. Э.,
ЧЕДОВА И. Б., *СЕМНОХИНА А. Ф.

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва*, МГУ

Индукция свелтасом и пероксидических митохондрий больных параличей головного мозга крысы с индукторами ПОЛ (железо-аскорбатной смесью) сопровождается торможением деаминации серотонина (субстрат МАО-А) в митохондриях, но не в цитозоле, а одновременно — ингибированием деаминации ГАМК и глюкозамина в обеих фракциях. Окисление 2-фенилэтиламина (ФЭА) (субстрат МАО-В) в этих условиях insignificantly не изменяется. Пиразидол, селективный ингибитор МАО-А, эффективно тормозит деаминацию серотонина, ГАМК и глюкозамина, но не ФЭА. МАО-азы и гидразиды аминокислотных кислот (ингибиторы модифицируемых МАО и модифицируемых аминокислот) ингибируют деаминацию ГАМК и глюкозамина.

Предполагается, что индуцируемое ПОЛ модифицирование каталитических свойств мембраносвязанных МАО стимулирует ПОЛ в синапсах и пероксидических митохондриях больных параличей головного мозга. Это сопровождается снижением деаминации серотонина и ФЭА и увеличением деаминации ГАМК и глюкозамина.

Предполагается, что индуцируемое ПОЛ модифицирование каталитических свойств мембраносвязанных МАО может внести существенный вклад в нарушение медиаторных процессов в мозгу, в частности провоцировать возникновение приступов эпилептических судорог.

Моноаминоксидазы (К.Ф. 1.4.3.4) катализируют реакцию окислительного деаминации моноаминов в ЦНС и периферических тканях [1]. Активность МАО является одним из существенных факторов, определяющих уровень ряда нейромедиаторов в головном мозгу, и таким образом, важным механизмом регулирования самих медиаторных процессов [1]. В условиях стимуляции ПОЛ в биомембранах МАО претерпевают модифицирование — такое изменение ферментативных свойств, в результате которого наряду с некоторым снижением скорости окисления биогенных моноаминов появляются качественно новые реакции деаминации целого ряда азотистых соединений, к числу которых относятся аminosахара, ди- и полнамны, нуклеотиды, некоторые аминокислоты, такие как лизин и ГАМК [1].

К настоящему времени накоплен значительный материал о качественном изменении каталитических свойств МАО при стимуляции ПОЛ *in vivo* и *in vitro* [1—3], однако сравнительное изучение роли ПОЛ в модификации синапсомных и митохондриальных МАО мозга до сих пор не было проведено.

Целью настоящей работы было изучение возможного участия МАО синапсом и митохондрий мозга в дезаминировании ГАМК и глюкозамина при стимуляции ПОЛ *in vitro*, а также во время эпилептиформного судорожного припадка, развитие которого сопровождается интенсификацией процессов ПОЛ [4—6].

Материалы и методы

В экспериментах использовали крыс линий Wistar и Крушинского-Молодкиной с наследственной аудиогенной эпилепсией, генерализованный судорожный припадок у которых индуцировали звуком электрического звонка (110—120 дБ, 90 с).

Синапсомы и несинаптические митохондрии из больших полушарий мозга выделяли по методу Hajos [7], однократно промывали в 10 мМ фосфатном буфере (рН 7,4) и суспендировали в 20 мМ фосфатном буфере (рН 7,4). Для стимуляции ПОЛ синапсомы и митохондрии (10—15 мг белка/мл) инкубировали с 10 мкМ Fe^{2+} и 0,5 мМ аскорбатом 15 мин при 37° [3]. Содержание одного из вторичных продуктов ПОЛ малонового диальдегида (МДА) определяли в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой [8]. Для определения активности МАО пробы (1—2 мг белка синапсом или митохондрий) инкубировали в 1,8 мл 20 мМ фосфатного буфера (рН 7,4) в аэробных условиях в течение 30 мин при 37° с 5 мМ серотонином (субстрат МАО-А), 0,4 мМ ФЭА (субстрат МАО-Б), 10 мМ ГАМК или 8 мМ глюкозамином (субстраты модифицированных МАО). За это время имела место линейная зависимость между длительностью инкубации и количеством образующегося аммиака. Реакции останавливали добавлением ТХУ (конечная концентрация 5%), осадок удаляли центрифугированием, а в надосадочной жидкости определяли содержание освободившегося в ходе реакции аммиака методом изотермической микродиффузии с последующей нesslerизацией [1].

Селективный ингибитор МАО-А пипразидол [9], ингибиторы активности диаминооксидаз гидразиды хинолин-2- и хинолин-6-карбоновых кислот [10], ингибитор модифицированной активности МАО изониазид [1] добавляли в среду инкубации вместе с одним из субстратов. Содержание белка определяли биуретовым методом [11] или методом Lowry [12] с БСА в качестве стандарта.

В работе использовали серотонин креатинсульфат («Reanal», Венгрия), глюкозамин HCl («Sigma», США), кристаллический БСА, ГАМК, 2-тиобарбитуровую кислоту («Calbiochem», США). Остальные реактивы были отечественного производства максимальной доступной чистоты.

Инкубация синапсом и несинаптических митохондрий больших полушарий головного мозга крыс с индукторами ПОЛ приводит к повышению накоплению МДА в синапсосамах (в 1,8 раза) и в митохондриях (в 2,5 раза). Это сопровождается стимуляцией ГАМК- и глюкозамин-дезаминазных активностей (в 3—4 раза) в обеих фракциях. Скорость дезаминирования ФЭА в синапсосамах и митохондриях, серотонина в синапсосамах значительно не изменяется ($p > 0,3—0,8$), в то время как скорость дезаминирования серотонина в митохондриях снижается в среднем на 45% (табл. 1). Соотношения скоростей дезаминирования ГАМК:серотонин и глюкозамин:серотонин, отражающие взаимосвязь между индуцируемой и «классической» активностями MAO, возрастает в условиях стимуляции ПОЛ в 3—5 раз.

Добавление селективного ингибитора MAO-A празидола сильно ингибирует дезаминирование ГАМК и полностью тормозит дезаминирование глюкозамина и серотонина. Дезаминирование ФЭА при этом значительно не изменяется (табл. 2). Приведенные результаты полностью согласуются с предыдущими данными [1, 2] о том, что дезаминирование ГАМК и серотонина в условиях стимуляции ПОЛ, очевидно, катализируют именно модифицированные MAO-A.

Ранее было установлено, что активность модифицированных MAO чувствительна к изониазиду и другим ингибиторам диаминоксидаз [1]. В настоящей работе мы исследовали чувствительность ГАМК- и глюкозамин-дезаминазных активностей модифицированных MAO в условиях стимуляции ПОЛ к действию изониазида и двух новых эффективных ингибиторов диаминоксидаз [10]. Результаты, приведенные в табл. 3, свидетельствуют о том, что дезаминирование ГАМК и глюкозамина, катализируемое синапсосомными и митохондриальными MAO, модифицированными в условиях стимуляции ПОЛ, существенно ингибируются всеми исследованными соединениями.

Аудиогенный эпилептиформный судорожный припадок у крыс линии Крушинского-Молодкиной приводит к повышению содержания МДА в синапсосамах и несинаптических митохондриях больших полушарий головного мозга (табл. 4), что сопровождается существенным повышением скорости дезаминирования серотонина и ФЭА в обеих фракциях. В то же время дезаминирование ГАМК и глюкозамина резко возрастает (в 5 и более раз). Отношение скоростей дезаминирования ГАМК:серотонин увеличивается от 0 до 2,62 в синапсосамах и от 0,06 до 2,1 в митохондриях. Аналогичные изменения обнаружены и в соотношении скоростей дезаминирования глюкозамин:серотонин; в митохондриях оно повышается от 0,07 до 1,03, а в синапсосамах—от 0,01 до 1,08.

Ранее было установлено [1, 2], что стимуляция ПОЛ *in vitro* и *in vivo* в митохондриях мозга и других тканей приводит к изменению каталитических свойств MAO-A. Это изменение характеризуется появлением качественно новых реакций дезаминирования азотистых

Таблица 1

Влияние стимуляции ПОЛ на содержание малонового диальдегида (МДА) и дезаминацию азотистых соединений в митохондриях и синаптосомах головного мозга

Условия опыта	Содержание МДА	Дезаминация				Соотношение скоростей дезаминации	
		серотонина	2-Фенил-этиламина	ГАМК	глюкозамина	ГАМК: серотонин	глюкозамин: серотонин
Синаптосомы							
Контроль	3,4±0,6	3,6±0,4	2,2±0,4	0,5±0,3	0,7±0,2	0,14	0,19
ПОЛ	6,0±0,7	3,4±0,6	1,7±0,4	1,6±0,3	2,9±0,6	0,47	0,85
p	<0,001	н. д.	н. д.	<0,01			
Митохондрии							
Контроль	2,3±0,1	8,9±1,0	3,2±0,5	1,1±0,4	1,3±0,4	0,12	0,15
ПОЛ	5,7±0,8	4,9±0,9	3,2±0,6	4,0±0,7	4,7±0,8	0,82	0,96
p	<0,001	<0,02	н. д.	<0,001	<0,01		

Примечание. Содержание МДА выражено в нмоль/мг белка. Скорость дезаминации азотистых соединений выражена в нмоль NH₃/мин на 1 мг белка. н. д.— различия статистически недостоверны (p>0,05). В каждой серии по 3—8 опытов.

соединений, которые обычно не являются субстратами MAO. Обнаружена существенная тканевая вариабельность модифицированных активностей MAO, измеренных с различными азотистыми соединениями в качестве субстратов [1, 2]. При этом оказалось, что глюкозамин является одним из лучших субстратов модифицированных MAO [1, 13]. Известно, что суммарная митохондриальная фракция мозга

Таблица 2

Влияние пипразидола на дезаминирование азотистых соединений в системах с пренкубированными в присутствии индукторов ПОЛ несинаптическими митохондриями из больших полушарий мозга крыс

Субстрат	Контроль	+ 1 мМ пипразидол
	нмоль NH ₃ /мин на 1 мг белка	
Серотонин	4,9±0,9	0
β-Фенилэтиламин	3,2±0,6	2,5±0,6
ГАМК	4,0±0,7	0,5±0,2
Глюкозамин	4,7±0,8	0

Примечание. Митохондрии пренкубировали с индукторами ПОЛ (Fe²⁺ и аскорбатом), после чего измеряли скорость дезаминирования азотистых соединений в присутствии 1 мМ пипразидола или без него. В каждой серии по 3—7 опытов. Аналогичные результаты были получены и в опытах с синапсосомами.

Таблица 3

Влияние ингибиторов модифицированных MAO и диэтилоксидаза на дезаминирование ГАМК и глюкозамина в системах с фракциями синапсосом или несинаптических митохондрий больших полушарий головного мозга крыс в условиях стимуляции ПОЛ

Добавки (1 мМ) в среду измерения	ГАМК		Глюкозамин	
	Синапсосомы	Митохондрии	Синапсосомы	Митохондрии
	нмоль NH ₃ /мин на 1 мг белка			
Без добавок				
Изониазид	1,6±0,4 0,1	3,9±1,2 0,2	2,8±0,8 0,5±0,3	4,5±0,6 1,4±0,5
Гидразид хинолин-7-карбоновой кислоты	0	0	0	0
Гидразид хинолин-6-карбоновой кислоты	0	0	0,2	0,2

Примечание. Митохондрии и синапсосомы пренкубировали с индукторами ПОЛ (Fe²⁺ и аскорбатом), после чего определяли ГАМК- и глюкозаминдеаминазные активности в присутствии указанных ингибиторов. В каждой серии по 3—7 опытов.

обычно содержит синапсосомы (осмотически активные частицы нервных окончаний), в «которых сохранены все главные структурные особенности нервных окончаний» [14]. Поэтому оставался открытым вопрос: где локализована ГАМК-деаминазная активность модифицированных MAO мозга (в синапсосомах, в митохондриях или в обеих

Таблица 4

Деаминарование азотистых соединений и содержание малонового диальдегида (МДА) в синапсосамах и митохондриях мозга крыс линии Крушинского-Молодкиной при эпилептиформном судорожном припадке

Условия опыта (группа животных)	Содержание МДА	Деаминарование:				Соотношение скорости деаминации	
		серотонина	2-фенил-этиламина	ГАМК	глюкозамина	ГАМК: серотонин	глюкозамин: серотонин
Синапсосы Контроль (крысы линии <i>Wistar</i>)	$1,80 \pm 0,04$	$7,0 \pm 0,5$	$4,5 \pm 1,0$	0	$0,1 \pm 0,1$	0	0,01
Эпилептиформный припа- док (крысы линии Кру- шинского-Молодкиной) р	$2,6 \pm 0,1$ <0,001	$1,30 \pm 0,03$ <0,001	$0,6 \pm 0,2$ <0,05	$3,4 \pm 0,2$ <0,001	$1,4 \pm 0,1$ <0,001	2,62	1,05
Митохондрии Контроль (крысы линии <i>Wistar</i>)	$1,30 \pm 0,04$	$8,2 \pm 0,9$	$4,7 \pm 0,9$	$0,5 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,3$	0,06	0,67
Эпилептиформный припа- док (крысы линии Кру- шинского-Молодкиной) р	$3,6 \pm 0,1$ <0,001	$3,1 \pm 0,2$ <0,01	$1,2 \pm 0,3$ <0,05	$6,5 \pm 0,1$ <0,001	$3,2 \pm 0,2$ <0,001	2,10	1,03

Примечание. Содержание МДА выражено в нмоль/мг белка. Скорость деаминации аминов—в нмоль/мин на 1 мг белка. В каждой серии по 3—8 опытов.

фракциях)? Результаты настоящей работы показывают, что ПОЛ стимулирует в 3—4 раза ГАМК- и глюкозамин-дезаминазные активности как в синаптосомах, так и в несинаптических митохондриях. Реакции ферментативного дезаминирования ГАМК и глюкозамин в обеих фракциях характеризуются высокой чувствительностью как к селективному ингибитору MAO-A пипразидолу, так и к ингибиторам модифицированных MAO (изолизиду и гидразидам хинолин-карбоновых кислот). На это указывает сопоставление результатов, приведенных в табл. 1 и 4, согласно которым активность MAO A (субстрат серотонин) и MAO B (субстрат ФЭА) подавляется при индуцировании ПОЛ в синаптосомах, но не в митохондриях. Кроме того, в синаптосомах, в отличие от митохондрий, при отсутствии эффекта индуцирования ПОЛ практически не наблюдалось дезаминирования ГАМК и глюкозамин.

Недавно было установлено, что инкубация липоксигеназы ретикулоцитов с митохондриями печени крысы вызывает качественное модифицирование мембраносвязанных MAO, сопровождающееся появлением диаминооксидазоподобной активности (субстрат: путресцин) [15]. Этот подход, пока неиспользованный в наших экспериментах, представляет значительный интерес для установления механизмов модифицирования каталитических свойств MAO *in vivo*. Можно предположить, что в ингибировании модификации каталитических свойств мембраносвязанных MAO при некоторых физиологических и патологических состояниях участвует фермент, выполняющий сходные с липоксигеназой функции.

По современным представлениям, интенсификация ПОЛ в головном мозгу способствует формированию такого патогенетически важного механизма, как качественное изменение ферментативной инактивации нейромедиаторов; при этом существенное значение должна иметь модификация каталитической активности MAO [16]. Если допустить, что MAO синапсом и несинаптических митохондрий имеют соответственно пре- и постсинаптическую локализацию, обнаруженные в наших опытах *in vivo* и *in vitro*, изменения активности этих ферментов позволяют рассмотреть следующий механизм ПОЛ-индуцированного, MAO-зависимого нарушения инактивации медиаторов в головном мозгу. Снижение дезаминирования моноаминов в мозгу должно способствовать пресинаптическому накоплению аминов и ингибированию процессов их постсинаптической инактивации. Повышение ГАМК-дезаминазной активности должно, по-видимому, вызывать снижение пресинаптического содержания ГАМК. Все это может привести к нарушению сопряжения процессов торможения и возбуждения в ЦНС с очевидным преобладанием последних. Рассмотренный механизм хорошо согласуется с данными, полученными в настоящей и других работах на примере экспериментальной модели эпилепсии у животных: 1. Развитие эпилептической активности сопровождается интенсификацией процессов ПОЛ [4, 16] (табл. 4); 2. Крысы линии Крушинского-Молодкиной характеризуются повыше-

нием содержания ряда моноаминов в головном мозгу [17]; 3. При эпилептическом судорожном припадке имеет место качественное изменение каталитических свойств MAO синапсом и несинаптических митохондрий, сопровождающееся появлением ГАМК-деаминазной активности (табл. 4) и снижением содержания ГАМК в головном мозгу [18, 19]. Аналогичные изменения (стимуляция ПОЛ, модификация MAO с появлением ГАМК-деаминазной активности в митохондриальной фракции мозга, снижение уровня ГАМК) были обнаружены в головном мозгу крысы с судорожным синдромом, вызванным токсическим действием кислорода во время гипербарической оксигенации [20].

Принято считать, что в норме содержание ГАМК в головном мозгу контролируется активностью двух ферментов [19]: глутамат-декарбоксилазы, катализирующей образование ГАМК из глутамата, и ГАМК-трансминазы, катализирующей перенос аминогруппы между ГАМК и 2-оксоглутаратом. Согласно нашим данным, индуцируемая ПОЛ модификация каталитических свойств MAO с появлением ГАМК-деаминазной активности может определять возможность участия модифицированных MAO в катаболизме ГАМК как в синапсомах, так и в несинаптических митохондриях мозга. Это, очевидно, приводит к вовлечению MAO в формирование патологически функционирующих регуляторных систем, которым придается важное значение в возникновении различных патологических состояний в ЦНС [5, 16].

MODIFICATION OF CATALYTIC PROPERTIES OF BRAIN MEMBRANE-BOUND MONOAMINE OXIDASES DURING LIPID PEROXIDATION

MEDVEDEV A. E., RAIGORODSKAYA D. I., GORKIN V. Z., *FEDOTOVA I. B.,
*SEMIOKHINA A. F.

Institute of Biological and Medical Chemistry, Academy of Medical Sciences
of the USSR, Moscow
*Moscow State University

Effects of lipid peroxidation (LPO) on the catalytic properties of membrane-bound monoamine oxidases (MAO) were studied in brain synaptosomes and nonsynaptic mitochondria. The incubation of both fractions with LPO inducers (Fe^{2+} + ascorbate) was shown, to be accompanied by a marked increase in glucosamine- and γ -amino butyric acid (GABA) deamination, sensitive to inhibitors of modified MAO activity (isoniazid, hydrazides of quinoline carbonic acids). Simultaneously, deamination of serotonin (MAO-A substrate) was markedly decreased in mitochondria, but not in synaptosomes, while deamination of 2-phenyl-ethylamine (PEA; substrate of MAO-B) was insignificantly changed in both fractions. Pyrazidol, a selective inhibitor of MAO-A, decreased the deamination of serotonin, GABA and glucosamine, but not PEA.

Audiogenic epileptiformic seizures in Krushinskii-Molodkina strain rats intensified LPO in brain, which was accompanied by activation of GABA- and glucosamine deamination with simultaneous inhibition of serotonin and PEA deamination.

The data obtained suggest that LPO-induced alteration in catalytic properties of MAO may make a valuable contribution in impairment of neurotransmitter processes in brain under different neuropathological disorders, characterized by intensive LPO.

ЛИТЕРАТУРА

1. Горкин В. З. Амвоксендамы и их значение в медицине. М., Медицина, 1981.
2. Gorkin V. Z. In: Structure and functions of amine oxidases (Mondolfi B. ed), CRC Press, Boca Raton, Florida, p 205-208, 1985.
3. Антипов А. Д., Гириш В. А., Ларова Н. Ф., Хованских А. Е., Казан В. Н. Булл. экспер. био. и мед. т. 57, № 2, с. 169-171, 1989.
4. Пикушкин Л. В., Крыжановский Г. Н. Патол. физиол. и экспер. тер. № 3, с. 19-24, 1987.
5. Крыжановский Г. Н. Патол. физиол. и экспер. тер. № 2, с. 3-8, 1990.
6. Медведева А. Е., Гейгородская Д. И., Горкин В. З. В кн.: Физиология и биохимия медиаторных процессов, М., с. 191, 1990.
7. Hajos F. Brain Res. v. 93, p. 485-489, 1975.
8. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Anal. Biochem. v. 95, p. 351-358, 1979.
9. Вережкина Н. В., Аснина В. В., Горкин В. З., Машковский М. Д. Вопр. мед. химии т. 29, № 5, с. 118-123, 1983.
10. Грачева Н. И., Груднев Л. И., Точилкин А. И., Горкин В. З. Хим.-фарм. ж. т. 22, № 11, с. 1526-1539, 1988.
11. Gornall A. G., Bardawill C. J., David M. J. Biol. Chem., v. 177, p. 751-766, 1949.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. J., Randa'l R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 165-175, 1951.
13. Goroshinskaya I. A., Bronovizkaya Z. G., Gorkin V. Z. Sovm. Psychopharmacol., v. 1, p. 39-47, 1977.
14. Whittaker V. P., Michaelson I. A., Kirk'and J. A. Biochem. J., v. 90, p. 293-303, 1964.
15. Weisner R., Kasdtschke A., Kähn H., Anton M., Schewe T. Blochim. Blophys. Acta. v. 986, p. 11-17, 1989.
16. Крыжановский Г. Н. Патол. физиол. и экспер. тер. № 5, с. 75-84, 1989.
17. Долina С. А. Ж. невропатол. и психиатр. им. Корсакова, т. 82, с. 841-849, 1982.
18. Antezark G., Horton R. W., Meldrum B. S., Sawaya C. M. Biochem. Pharmacol., v. 25, p. 413-417, 1976.
19. Meldrum B. S. Clin. Neuropharmacol., v. 5, p. 293-316, 1982.
20. Горошинская И. А. Вопр. мед. химии т. 25, № 3, с. 328-333, 1979.

Получила 20. II. 1991

УДК 636:612:398:577.1

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ГАМК-ТРАНСАМИНАЗЫ
О-СУЛЬФОЭТАНОЛАМИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ
ГОРМОНАЛЬНО-МЕДИАТОРНОГО И ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО
ОБМЕНА ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИИ

КРИМЯН А. Ю., ПОЛЬТАВЯН Т. А., АРАКЕЛЯН Л. М., КАМАЛЯН А. Р.,
АГАБАЛЯН М. Л., КАМАЛЯН Р. Г.

Ереванский государственный зооветеринарный институт

Работа посвящена изучению влияния ингибитора ГАМК-трансаминазы мозга О-сульфоэтанолamina (СЭА) на метаболические показатели как у нормальных крыс, так и при на иммобилизационном стрессе.

Показано, что внутривенное введение СЭА в дозе 1 г·кг⁻¹ массы через 16 ч приводит к резкому повышению ГАМК в мозгу как интактных, так и иммобилизованных в течение 2 ч до убоя животных.

Введение препарата и в большей степени сама иммобилизация сопровождается повышением концентрации кортикостерона в крови и надпочечниках, хотя препарат ослабляет эффект иммобилизации, от есть смягчает реакцию надпочечников на стресс. При этом отмечается тенденция к накоплению энергетических субстратов в крови (глюкоза и пируват) и печени (триглицериды), что также свидетельствует о смягчении стресс-реакции и более экономном использовании источников энергии, не прослеживаются какие-либо изменения в интенсивности течения процессов ПОЛ в мозговой и печеночной тканях опытных групп животных и наблюдается некоторое уменьшение активности аспартатаминотрансферазы в мозгу иммобилизованных крыс при предварительном введении препарата.

Полученные результаты позволяют предположить об антитетическом действии СЭА, обусловленном, по всей вероятности, генерацией ГАМК в мозгу.

Фармакопрофилактика стресса, достигаемая применением различных средств успокаивающего действия на ЦНС [1, 2], является одним из способов снижения воздействия большого числа внешних и внутренних неблагоприятных факторов на живой организм. Механизм действия последних обусловлен в основном активацией тормозных процессов в нейронах [3, 4]. Исследуемое нами производное этилоламина СЭА является ингибитором ГАМК-трансаминазы [5], способствует накоплению основного тормозного медиатора ЦНС ГАМК. Использование с отмеченной целью самой ГАМК оказывается менее эффективным из-за непроницаемости или частичной проницаемости ее через ЭБВ, в то время как эти же ограничения не касаются СЭА, вызывающего более чем двукратное повышение уровня ГАМК в мозгу.

Исходя из вышесказанного, мы исследовали эффективность СЭА в качестве противострессорного препарата при иммобилизации крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на белых крысах-самцах массой 220—250 г, содержащихся на обычном нормированном рационе и укомплектованных в следующие опытные группы: I—интактный контроль, II—внутрибрюшинное введение СЭА, III—иммобилизация в течение 2-х ч, IV—иммобилизация с предварительным введением СЭА, синтезированного в Институте органической химии АН Армении [6], идентифицированного по инфракрасному и ПМР спектрам, а также по биологическому тесту (повышение уровня ГАМК в мозгу).

Крысам вводили внутрибрюшинно 20%-ный водный раствор препарата из расчета 1 г/кг⁻¹ массы. Через 14 ч животных иммобилизовали помещением их в специальные пластмассовые пеналы и спустя 2 ч декалентировали под слабым эфирным наркозом и определяли содержание кортикостерона в крови и надпочечниках [7], глюкозы [8] и пирувата в крови [9], активность NADPH и аскорбат-зависимого ПОД [10] и трансаминаз [11] в гомогенатах печени и мозга, содержание липидов [12, 13] и ГАМК [14] в мозговой и печеночной тканях соответственно. Полученный материал подвергнут статистической обработке с использованием критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют о том, что как иммобилизация, так и введение СЭА повышают уровень кортикостерона в крови и надпочечниках, хотя и действие последнего ока-

Таблица 1

Количественные сдвиги в содержании кортикостерона в крови (мкг%) и в надпочечниках (мкг·г⁻¹) белых крыс

Органы	Группы животных			
	1	2	3	4
Кровь	12,5±0,56	20,64±0,93*	25,50±1,59*	20,82±0,68**
Надпочечники	33,29±1,68	38,62±1,74*	44,34±2,39*	35,49±1,84**

Примечание. Здесь и в табл. 4, 5 *—достоверные сдвиги в сравнении с интактным контролем (группа 1), **—достоверные сдвиги в сравнении с иммобилизацией (группа 3).

зывается значительно слабее. Так, если иммобилизация приводит к двухкратному увеличению содержания кортикостерона в крови (12,75 и 25,50 мкг%), то введение СЭА интактным крысам сопровождается увеличением уровня гормона приблизительно на 62,5%. В надпочечниках возрастание концентрации кортикостерона при иммобилизации составляет примерно 33,2%, а при введении препарата интактным

крысам—16,0%. Характерно, что введение препарата до иммобилизации предотвращает эффект последней на уровень гормона в крови и особенно в надпочечниках, где отмечается почти полное блокирование нарастания концентрации гормона. Если рассматривать повышенный уровень кортикостерона в крови и надпочечниках как показатель интенсивности стресс-реакции, то на фоне предварительного введения СЭА обнаруживается отчетливо выраженное ослабление эффекта, но не предотвращение ответной реакции организма на иммобилизацию, что мы склонны рассматривать как оптимальный ответ с превальировавшим адаптивного начала стресса, хотя и механизм действия препарата по сей день остается неразгаданным, если оставить в стороне его ГАМК-генерирующее действие и, возможно, непосредственное влияние на адаптивные механизмы. Наконец, не исключено также, что на фоне введения значительных количеств СЭА и достаточно длительной экспозиции препарата конечный результат в известной степени может быть обусловлен и эффектом этаноламина. Как уже отмечалось [15], при внутрибрюшинном введении последнего крысам, подвергшимся стрессу, в малых концентрациях имело место подавление выброса кортикостерона в кровь и синтеза его в надпочечниках.

Данные, представленные в табл. 2, показывают, что синтезированный нами препарат СЭА повышает уровень ГАМК при внутрибрюшинном введении в пределах 1,51—2,64 мкмоль·г, то есть приблизи-

Таблица 2

Содержание ГАМК (мкмоль·г ⁻¹) в мозгу белых крыс			
Группы животных			
1	2	3	4
1,51±0,08	2,61±0,11*	1,29±0,03	2,60±0,17**

тельно на 70,5%. При введении же его до иммобилизации, несзначительно снижающей уровень ГАМК в мозгу, отмечается почти 2-кратное возрастание концентрации медиатора. По-видимому, влияние СЭА на адаптивные механизмы, ответственные за реакцию надпочечников на стресс, обусловлено в определенной степени как генерацией ГАМК, так и других метаболитов, высвобождающихся из фермент-субстратного комплекса СЭА-ГАМК-трансаминазы [16].

Имеются данные о том, что СЭА может генерировать ГАМК не только путем ингибирования ГАМК-трансаминазы мозга, но и через активацию глутаматдекарбоксилазы [17, 18], локализованной в синапсосомах, то есть в непосредственной близости с ГАМК-ергическими нервными окончаниями. Предполагается, что фармакологическое действие ингибиторов ГАМК-трансаминазы определяется локальным увеличением ГАМК в отдельных нервных окончаниях, отличаю-

щихся чувствительностью к вышеуказанным соединениям, в частности к СЭА [19, 20]. Таким образом, результаты экспериментов, представленные в табл. 1 и 2, позволяют говорить о противострессорной направленности эффектов СЭА, хотя мы однозначно не располагаем обуславливающими их конкретными механизмами.

Учитывая разногласия по поводу специфичности ингибирующего действия СЭА [5, 17, 21] на ГАМК-трансаминазу и возможность его влияния на другие пиридоксальные ферменты, причем противоположной направленности [17, 21], мы предприняли исследования по определению активности аспартат- и аланинаминотрансфераз в мозгу и печени крыс (табл. 3), исходя также из того, что по ряду данных эти ферменты вовлекаются в общую стрессорную реакцию [22, 23].

Таблица 3

Активность трансаминаз в органах белых крыс
(мкмоль пирувата ч⁻¹.г⁻¹)

Срганы		Г р у п п ы животных			
		1	2	3	4
Мозг	АЛГ	43,3 ± 6,0	5,30 ± 1,47	34,2 ± 3,0	28,8 ± 3,2
	АСГ	962,50 ± 77,47	983,5 ± 14,0	779,0 ± 47,2	583,5 ± 52,5
Печень	АЛТ	1750,0 ± 185,7	2116,0 ± 219,9	1550,0 ± 112,2	1583,0 ± 162,9
	АСГ	1500,0 ± 150,0	1291,0 ± 16,6	1230,0 ± 132,0	1335,0 ± 107,1

Примечание. АЛТ—аланинаминотрансфераза, АСТ—аспартатаминотрансфераза.

Как видно из результатов, представленных в табл. 3, они характеризуются значительным разбросом, но сообщают тем не менее определенную информацию о том, что иммобилизация сопровождается тенденцией к уменьшению активности в мозгу аспартатаминотрансферазы, усиливающейся, однако, введением СЭА, который сам по себе достоверных сдвигов в активности исследуемых ферментов в органах не вызывает. Под действием препарата не отмечается сдвигов и в основном энергетическом субстрате—глюкозе крови, но обнаруживается достоверное повышение содержания пирувата (табл. 4). Предварительное введение СЭА перед иммобилизацией по сравнению с введением препарата нитактным крысам приводит к повышению уровня глюкозы примерно на 33,3 и 21% по сравнению с иммобилизацией без введения препарата. В отношении количественных сдвигов пирувата эффект от иммобилизации оказывается слабее эффекта при введении препарата, что и проявляется в серии исследований «препарат+иммобилизация».

Таким образом, введение СЭА перед иммобилизацией способствует некоторому ослаблению стресс-реакции и более экономному использованию таких энергетических субстратов, как глюкоза и пируват.

Увеличение уровня глюкозы, интенсивно потребляемой мозгом, в больших количествах может быть вызвано действием СЭА, способствующего использованию и других, помимо глюкозы, эндогенных для мозга субстратов окисления. Так, например, показано [24] подавление процесса использования глюкозы срезами мозга при введении крысам СЭА, чем объясняется анорексический эффект последнего.

Таблица 4

Количественные сдвиги в содержании глюкозы и пирувата в крови белых крыс (ммоль.л⁻¹)

	Г р у п п ы ж и в о т н ы х			
	1	2	3	4
Глюкоза	5.24±0.09	5.57±0.29	6.13±0.55	7.43±0.14
Пируват	0.370±0.005	0.587±0.007*	0.45 ±0.006*	0.591±0.009**

Характерные изменения отмечаются в содержании липидных фракций печени со сдвигом в сторону образования триглицеридов, что особенно отчетливо прослеживается в группе «СЭА+иммобилизация», где по сравнению с интактной группой количество указанных соединений увеличивается приблизительно в 1,9 и 1,6 раза

Таблица 5

Содержание липидов (мг.г⁻¹ ткани) в печени белых крыс

Фракции липидов	Г р у п п ы ж и в о т н ы х			
	1	2	3	4
Фосфолипиды	9.19±0.29	8.20±0.28*	8.80±0.38	7.33±0.20**
Холестерин	1.10±0.11	1.33±0.68	1.92±0.18*	1.93±0.05
			p<0.02	
Свободные жирные кислоты	1.83±0.70	1.53±0.18	0.93±0.10*	1.15±0.71
			p<0.001	
Триглицериды	4.43±0.28	6.93±0.14*	5.35±0.31	8.53±0.32**
Эфиры холестерина	1.97±0.27	2.67±0.14*	2.68±0.21*	3.53±0.18**

по сравнению с группой иммобилизации (табл. 5). Этот процесс сопровождается также увеличением содержания холестерина и его эфиров и снижением концентрации фосфолипидов и свободных жирных кислот. Мы пока лишены возможности однозначно интерпретировать наблюдаемые сдвиги в изученных звеньях липидного метаболизма. Вероятнее всего, они обусловлены мобилизацией жировых депо на фоне накопления в печени триглицеридов, и, наоборот, уменьшения в

ней уровня фосфолипидов. Так или иначе, при иммобилизационном стрессе энергосберегающий эффект СЭА очевиден, что, по-видимому, является признаком оптимизации метаболизма в экстремальных условиях. Как видно из данных табл. 6, процессы ПОЛ в печени и мозгу крыс в условиях наших экспериментов не претерпевают существенных сдвигов.

Таблица 6

Количественные сдвиги в содержании малонового диальдегида (ммоль·мин⁻¹·мг⁻¹ белка) в гомогенатах мозга и печени при NADPH и аскорбатзависимом перекислении липидов

		Г р у п п ы			
		1	2	3	4
NADPH	мозг	0,93±0,07	0,92±0,06	0,93±0,07	0,91±0,13
	печень	0,78±0,09	0,79±0,07	0,73±0,05	0,67±0,08
Аскорбат	мозг	1,35±0,11	1,28±0,09	1,42±0,15	1,27±0,18
	печень	0,85±0,09	0,90±0,06	0,72±0,05	0,73±0,10

Результаты проведенных исследований позволяют заключить, что использованная нами модель иммобилизационного стресса вызывает существенные сдвиги в гормонально-энергетическом звене метаболизма, наблюдаемые при гипоккинезии. Использованный нами препарат СЭА, ингибирующий ГАМК-трансаминазу мозга и повышающий в нем уровень ГАМК, почти вдвое, ослабляет реакцию надпочечников на стресс, оптимизируя энергообеспечение тканей и, следовательно, может быть рекомендован в качестве мягкого стресспротекторного средства.

THE INFLUENCE OF THE O-SULFOETHANOLAMINE ON SOME HORMONAL AND METABOLIC PARAMETERS BY RATS IMMOBILISATION

KRIMIAN A. Ju., GJULBAYAZIAN T. A., ARAQUELIAN L. M., KAMALIAN A. R., AGABALIAN M. L., KAMALIAN R. G.

Zoo-veterinary Institute, Yerevan.

The influence of O-sulfoethanolamine (SEA) on some metabolic parameters affected by stress has been studied in intact and immobilized rats. The intraperitoneal administration of SEA in 1 g per kg dosage was shown to lead after 16 hours to the increase of the GABA levels in the brain of both intact rats and those immobilized 2h before the decapitation. The concentration of corti osterone in blood and suprarenal glands rised by immobilisation and SEA injection. However, the SEA pre-

vented the corticosterone increase induced by immobilisation. The tendency of energetic substrates accumulation in the blood (glucose and pyruvate) and the liver (triglycerins) has been obtained. The definite decrease in aspartate amino transferase activity in brain after the preliminary administration of SEA has been observed. The data obtained allow to propose the presence of stress-modifying effect of SEA caused most likely by the GABA generation in brain.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буэлама В. С. Сельское хозяйство за рубежом, № 8, с. 47—50, 1976.
2. Буэлама В. С., Мецгерков Н. П., Тауритис А. К. Ветеринария, № 8, с. 46—49, 1988.
3. Кашин А. С. Стресс животных и его фармакологическая регуляция. Барнаул, 1976.
4. Пляцenco С. И., Сидоров В. Т. Стрессы у сельскохозяйственных животных. Москва, 1987.
5. Fowler L. J., John R. A. Biochem. J., v. 130, № 2, p. 569—573, 1972.
6. Назаретян А. Х., Карапетян Л. П., Торосян Г. О. «Потребители-производители органических реактивов. Ярмарка идей», Ереван, 1989.
7. Ширинян Э. А. Лабораторное дело, № 2, с. 767—768, 1982.
8. Лукomsкая Н. С., Городецкий В. К. Биохимия, т. 26, вып. 3, с. 477—482, 1961.
9. Бабаскин П. М. Лабораторное дело, № 8, с. 197—200, 1976.
10. Ernster L., Nordenbrand E.—In: Methods in Enzymology (eds R. W. Estabrook M. E. Pulman), v. 10, p. 575, 1967.
11. Reitman S., Francel S. Amer. J. Clin. Path., v. 28, p. 56—58, 1957.
12. Bragdon J. A. Biol. Chem., v. 120, p. 513—517, 1951.
13. Folch J., Less M., Stanley S. J. Biol. Chem., v. 228, № 1, p. 497—509, 1957.
14. Roberts E., Harman P. J., Frankel S. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., v. 78, p. 799—805, 1951.
15. Гюльбаязян Т. А., Камалян Р. Г. Вопр. мед. химии, т. 8, с. 47—49, 1982.
16. Fowler L. J., John R. A. Biochem. J., v. 197, p. 149—154, 1981.
17. Lösher W. J. Neurochem., v. 36, № 4, p. 1521—1527, 1981.
18. Metcalfe B. W. Biochem. Pharmacol., v. 28, p. 1705—1712, 1979.
19. Ladorela M. J., Rains A., Gale K. J. Neurochem., v. 33, p. 1119—1123, 1979.
20. Lösher W. J. J. Neurochem., v. 31, № 5, p. 1603—1608, 1980.
21. Fletcher A., Fowler L. J. Biochem. Pharmacol., v. 29, № 11, p. 1451—1454, 1980.
22. Рубашкина Л. А. Автореф. канд. дис. Москва, 1974.
23. Тигранян Р. А. Гормонально-метаболический статус организма при экспериментальных воздействиях, Москва, 1990.
24. Nobrega J. N., Coscina D. V. Brain Res., v. 262, № 2, p. 243—252, 1983.

Поступила 15. XI. 1991

УДК 615.214.22:612.822.5.599.323.4:577.175.8

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ
«МИКРОТРУБОЧКОВОЙ КАТАСТРОФЫ»,
ВЫЗВАННОЙ НЕЙРОЛЕПТИКАМИ

БАРДАХЧЬЯН Э. А., МАКЛЯКОВ Ю. С., ХАРЛАНОВА Н. Г., КУЛИКОВА О. Н.

Научно-исследовательский противочумный институт
Государственный медицинский институт, Ростов-на-Дону

Исследовали изменения концентрации нейроспецифического белка S-100 и ультраструктуры в различных отделах ЦНС при введении нейролептиков—аминазина и галоперидола. На высоте действия препаратов показано увеличение в мозгу содержания белка S-100 и одновременное практически полное исчезновение микротрубочек в дендритах. В течение суток ультраструктура их восстанавливается, уровень белка S-100 практически не отличается от исходных значений. Обсуждаются возможные причины дезагрегации и агрегации микротрубочек.

Впервые микротрубочки были обнаружены более четверти века тому назад и почти тогда же им была отведена роль опорного элемента цитоскелета. Однако в настоящее время с введением современного метода компьютерного усиления изображения, получаемого в световом микроскопе, представилась возможность доказать участие их в перемещении пузырьков и органелл в цитоплазме и отростках нервных клеток [1]. Помимо внутриклеточного и аксонального транспорта, микротрубочкам в НС приписывают участие в синаптической передаче, кеплинге рецепторов, росте клеток и т. д. [2, 3].

Установлено обратимое связывание аминазина с тубулином и его ингибирующее действие на полимеризацию последнего в микротрубочки [4, 5]. Образующиеся при этом амальные структуры в виде агрегатов кроме тубулина содержат также повышенное количество микротубулонассоциированных белков [6], среди которых особое место занимает нейроспецифический белок S-100 [7, 8].

В связи с этим представлялось интересным проведение специального комплексного изучения биохимических и ультраструктурных изменений в различных отделах ЦНС при действии нейролептиков аминазина и галоперидола.

Материалы и методы

Исследование количественных изменений белка S-100 выполнено на 30 беспородных белых крысах-самцах массой 180—200 г (по 10 животных в каждой серии). Содержание белка S-100 в нео-

кортексе, гиппокампе, промежуточном мозгу и его стволовой части определяли при однократном внутривенном введении 5 мг/кг амиазина (производное фенотиазинового ряда) или галоперидола (производное бутирофенонов). Контрольным животным вводили адекватные объемы стерильного физиологического раствора. Через 3 ч после инъекции каждого из нейролептиков, то есть на пике фармакологического действия препаратов, а также спустя сутки водорастворимую фракцию белка S-100 исследовали с помощью диск-электрофореза в 20%-ном ПААГ в первой щелочной системе по Мауреру с рН-разделением 9,5 [9]. Полученные результаты статистически обработаны.

Для электронно-микроскопического исследования (27 крыс) сенсомоторной коры, таламуса, гиппокампа, хвостатого ядра и центрального серого вещества использована глицероформальная фиксация. Экспериментальный материал от 18 животных изолировали через 30 мин, 3 и 24 ч (по 3 животных на каждый срок и на каждый нейролептик) после введения препаратов. В качестве контроля использовали 9 животных. После общепринятой обработки кусочки тканей заключали в эпоксидный смол и для идентификации соответствующих структур с каждого блока делали срезы толщиной 1—2 мкм, окрашивали их метиленовым или толундиновым синим и просматривали в световом микроскопе. В передней теменной области выделяли зону (область РА, поле РА⁵), определяемую обзорным просмотром предварительно ориентированных для заточки блоков. Кусочки из V—VI слоев, в последующем изученные в электронном микроскопе, по морфологическим признакам характеризовались наличием крупных нейронов, функционально эквивалентных сенсомоторной области [10]. Ультратонкие срезы, полученные на ультрамикротоме LKB 8800, контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе JEM-100 S.

Результаты и обсуждение

Спустя 3 ч после внутривенного введения галоперидола в неокортексе обнаруживалось значительное (на 93,8%) повышение по сравнению с контролем содержания белка S-100. Как видно из рис. 1, в остальных отделах мозга увеличение концентрации белка носило менее выраженный характер—58—65% ($p < 0,05$). С другой стороны, амиазин за тот же промежуток времени приводил к падению уровня нейроспецифического белка S-100 в гиппокампе и неокортексе примерно на 62,5 и 39,5% ($p < 0,05$) соответственно. Спустя сутки отмечалось инволюционное изменение психолептического эффекта изученных нейролептиков, а количество белка S-100 снижалось до исходного уровня.

Таким образом, оба препарата на высоте фармакологического действия приблизительно в одинаковой степени способствовали по-

вышенно содержания белка S-100 в гиппокампе, а в неокортексе этот сдвиг был наиболее выраженным под действием галоперидола.

В контрольных экспериментах во все сроки наблюдения после внутрибрюшинного введения физиологического раствора электронно-

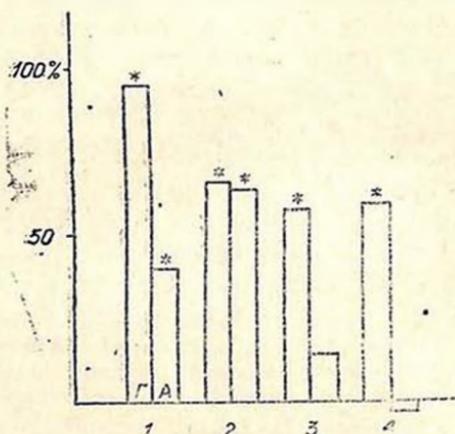


Рис. 1. Изменение содержания нейроспецифического белка S-100 в различных отделах головного мозга крысы при действии галоперидола (Г) и амиапаина (А) (в % к контролю): 1—неокортекс, 2—гиппокамп, 3—промежуточный мозг, 4—ствол мозга; * $p < 0,0$.

микроскопический анализ не позволил обнаружить сколько-нибудь заметных изменений в исследованных нервных структурах.

На фоне введения нейролептиков в течение первых трех часов в цитоплазме нейронов всех изученных отделов мозга наблюдалось наличие большого количества окаймленных везикул. Отмеченная ультраструктурная перестройка, являющаяся достаточно универсальной, по-видимому, обусловлена спецификой взаимодействия рецепторов с соответствующими лигандами за счет опосредованного рецепторами эндоцитоза [11—15]. Кроме того, оба изученных препарата вызывали ряд реактивных и деструктивных изменений, интерпретация которых станет предметом специального обсуждения в дальнейшем. В настоящем же сообщении мы остановимся лишь на вопросах, касающихся морфофункциональных изменений дендритного аппарата.

Согласно проведенным наблюдениям, у контрольных животных дендриты характеризуются наличием в них многочисленных микро-трубочек и других цитоплазматических органелл, выявляющихся на продольных срезах в виде параллельно вытянутых парных мембран, между которыми могут находиться тончайшие микрофиламенты; на поперечных срезах также прослеживается строгая упорядоченность окружных профилей диаметром в пределах 25 нм по наружному контуру (рис. 2, а). Результаты наших исследований согласуются с данными литературы [2, 16, 17].

Через 30 мин после введения амиапаина и галоперидола в дендритах нейронов изученных отделов ЦНС наиболее ранней реакцией является тотальное исчезновение микро-трубочек (рис. 2, б, в), ис-

зависящая ни от участка дендрита, ни от его диаметра. Спустя 3 ч после инъекции в отдельных клеточных отростках прослеживается появление микротрубочек, а к началу первых суток и полное восстановление их структуры, приобретающей иногда резко выраженный извитой характер.



Рис. 2. Резкое уменьшение количества микротрубочек в дендритах при введении нейролептиков: а—введение галоперидола (сенсомоторная кора); увел. 28000; б—введение амназина (сенсомоторная кора), увел. 20000

Как известно, фибриллярные элементы цитоплазмы (микротрубочки, микрофиламенты) различных клеток могут быть связаны с рецепторами клеточной поверхности и рассматриваться как рецепторно-скелетный комплекс [18, 19]. Полагают, что микротрубочки функционально и морфологически объединяют отдельные участки цитомембраны: они построены из кислого белка тубулина и обладают свойством быстро распадаться и восстанавливаться. Температурная зависимость этого процесса очевидна: низкая температура способст-

вует деполимеризации микротрубочек. Высокие концентрации Ca^{2+} , циклических нуклеотидов, в частности cGMP, способствующего реассоциации микротрубочек, величины pH и давления также выступают в качестве регуляторов указанного процесса. —

По-видимому, имеется связь между нейрональными рецепторами и микротрубочками, а контакты между молекулами галоперидола и аминазина с рецепторами оказываются небезразличными для фибриллярных элементов дендроплазмы. Реальность такого предположения очевидна, поскольку известно о существовании специфических ядов (колхицин, вибластин и т. д.), оказывающих разрушающее действие на микротрубочки и микрофиламенты (цитохалазины). Примечательно аналогичное действие некоторых местных анестетиков (дibuкаиn, прокаин, тетракаиn) [20].

Хотя выдвигаемая нами гипотеза слишком зирнорна и аргументируется принципами проведения аналогии, тем не менее она может способствовать привлечению внимания специалистов различного профиля для разрешения затронутой проблемы. С другой стороны, она привлекательна и с точки зрения нового понимания механизмов «микротрубочковой катастрофы» [21], в частности в оценке вклада нарушений синаптической трансмиссии, изменяющейся при действии нейролептиков. В настоящее время считается установленным, что угнетающее действие последних на характер поведенческих реакций животных обусловлено неактивным состоянием синаптического аппарата, в частности синаптических пузырьков, концентрирующихся в центре аксоплазмы [22]. Согласно данным других источников [23], изученные препараты благодаря разрушающему и растворяющему действию на синаптические везикулы вызывают нарушение процессов медиации.

Между тем результаты наших исследований во все сроки наблюдения (30 мин, 3 и 24 ч) позволили выявить наличие многочисленных синаптических пузырьков, располагающихся по всей терминали аксона и в области активных зон. Отсутствие каких-либо заметных повреждений в пресинаптических окончаниях дает основание полагать, что межнейрональные коммуникации при введении нейролептиков нарушались преимущественно за счет деструктивных изменений в дендритах. По-видимому, активное поглощение препарата нейронами за счет опосредованного рецепторами эндоцитоза и последующая деградация его лизосомальным аппаратом нейронов спустя сутки способствует сборке микротрубочек из димеров тубуллина.

Что касается микротрубочек нейронов центрального серого вещества, то в первые 30 мин после введения нейролептиков они подвергаются альтерациям лишь в части дендритов. Спустя 3 ч не отмечалось изменений в общей картине, которая в течение суток после действия препарата характеризовалась появлением незначительного количества микротрубочек.

Обсуждая роль различных факторов в сборке-разборке микротрубочек, мы обращали внимание на необходимость соблюдения ряда

условий, пренятствующих или способствующих этому процессу. В частности, имеются указания о том, что увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме нейронов предотвращает процесс сборки и, возможно, приводит к дезагрегации микротрубочек [24]. Кроме того, они в качестве вторичного мессенджера необходимы для внутри- и



Рис. 3. Ультраструктурные изменения синапсов при введении аминазина: *а*—деструкция аксо-дендритического синапса по темному типу (гиппокам), увел. 25000; *б*—образование многочисленных аксо-дендритических синапсов (гиппокам), увел. 20000.

межклеточной передачи возбуждения [25]. Поэтому логично допустить, что любые отклонения в содержании этих ионов, основным источником которых является внутриклеточная жидкость, могут

влиять как на структуру микротрубочек, так и на генерацию потенциалов. Принимая во внимание тот факт, что синаптический аппарат в ответ на действие аминазина и галоперидола повсеместно сохраняет интактность (за исключением гиппокампа), мы допускаем возможность развития нейролептического эффекта не за счет повреждения ультраструктуры синапсов, а в результате нарушений во вторичной мессенджерной системе.

Таким образом, помимо специфического влияния на нейроны, галоперидол и аминазин оказывают дестабилизирующее действие на микротрубочковый аппарат дендритов. В свою очередь, кальциевый эффект, индуцированный нейролептиками, отражается на механизмах синаптической передачи и обуславливает нейролептическое действие препарата.

Отличительной стороной действия аминазина является его разрушающее действие в гиппокампе, приводящее в отдельных случаях к деструкции синапсов по темному типу (рис. 3, а), то есть к необратимым повреждениям, завершающимся полным распадом синапса и фагоцитозом его астроцитами [26]. По-видимому, в ответ на подобные альтернативные изменения синапто-архитектоники в порядке компенсаторной реакции происходит установление новых нейрональных взаимоотношений. Они характеризуются тем, что в дендрите, лишенном микротрубочек, удается идентифицировать до 4—5 и более аксо-дендритических контактов (рис. 3, б), что повышает информативность межнейронных связей [26].

На основании полученных результатов можно заключить, что независимо от исследованного отдела мозга во всех случаях регистрируются максимально приближенные изменения. Инъекция нейролептиков сопровождается высвобождением белков, ассоциированных с микротрубочками, среди которых важное место занимает нейроспецифический белок S-100. Поскольку белки группы S-100 подвергаются Ca^{2+} -зависимому взаимодействию с достаточно широким кругом белков нервной ткани, в том числе и с тубулином [7], то становятся понятны эффекты аминазина и галоперидола, характеризующиеся дестабилизирующим действием в отношении микротрубочек.

ULTRASTRUCTURAL AND BIOCHEMICAL BASIS OF "MICROTUBULE CATASTROPHE" INDUCED BY NEUROLEPTICS

BARDAKHCHIAN E. A., MAKLIAROV Yu. S., KHARLANOVA N. G.,
KULIKOVA O. N.

Scientific Research Antiplague Institute, Medical Institute, Rostov on Don

Disturbances in neurospecific protein S-100 concentration and ultrastructural alterations in different parts of central nervous system after neuroleptics (aminazine and haloperidol) injection were investigated. At a peak of preparates action the protein S-100 content in brain was shown

to be raised. At the same time the microtubules practically completely disappears in dendrites. Twenty-four hours later the fine structure of microtubules was restored. Possible reasons of microtubules disaggregation and aggregation are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allen R. D. Ann. Rev. Biophysics and Biophys. Chem., v. 11, p. 265—290, 1985.
2. Воробьев В. С. — В кн.: Ультраструктура нейрона (Итоги науки и техники ВНИИТИ. Сер. Морфология человека и животных). М., т. 10, с. 6—26, 1983.
3. Lew's S. A., Isanoz I. E., Lee G.—H., Cowan N. J. Nature, v. 342, № 6249, p. 498—505, 1989.
4. Appri R. A. G., Sain J. R. Mol. Pharmacol., v. 19, p. 295—301, 1981.
5. Ekström P., Kanje M., Edström A. Acta Physiol. Scand., v. 116, p. 121—125, 1982.
6. Андросова Л. В., Бурбаева Г. Ш. Биохимия, т. 52, № 7, с. 1162—1168, 1987.
7. Полетаев А. Б., Мещерякова О. Д. Биохимия, т. 47, № 11, с. 1835—1838, 1982.
8. Полетаев А. Б., Шерстнев В. В. Успехи соврем. биол., т. 103, № 1, с. 124—132, 1987.
9. Маурер Г. Диск-электрофорез. М., Мир, 247 с., 1971.
10. Светухина В. М. Архив анат., т. 42, № 2, с. 31—45, 1962.
11. Повилайтите П. Е., Бардахчян Э. А., Вилков Г. А. Цитология и гуснетика, т. 20, № 5, с. 323—326, 1986.
12. Каркищенко Н. Н., Солодилов В. В., Бардахчян Э. А. Изв. Сев.—Кавк. науч. центра высш. шк., № 2, с. 122—127, 1987.
13. Бардахчян Э. А., Повилайтите П. Е., Поляк А. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 106, № 6, с. 730—733, 1988.
14. Макляков Ю. С., Страдомский Б. В., Бардахчян Э. А. Нейрохимия, т. 9, № 1, с. 91—95, 1990.
15. Dautry-Varsa A., Lodish H. F. Sci. Amer., v. 250, № 1, p. 48—54, 1984.
16. Питерс А., Палей С., Узбергер Г. Ультраструктура нервной системы. М., Мир, 1972.
17. Косицын Н. С. Микроструктура дендритов и аксодендритических связей в центральной нервной системе. М., Наука, 1976.
18. Yahara I., Edelman G. M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 72, p. 1579—1583, 1975.
19. Edelman G. M. Science, v. 192, p. 218—226, 1976.
20. Roth J. E. p. Pathol. (Iena), Suppl. 3, p. 186—186, 1978.
21. McIntosh J. R. Nature, v. 312, № 5931, p. 196—197, 1984.
22. Втюриц Б. В., Туманов В. П. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 72, № 10, с. 108—110, 1971.
23. Матвеев В. Ф. Морфологические изменения в головном мозге при экспериментальной дизергической нитоксикации. М., Медицина 1976.
24. Капуччинелли П. Подвижность живых клеток, М., Мир, 1982.
25. Шмидт Р., Тевс Г. Физиология человека. т. 1. Нервная система. М., Мир, 1985.
26. Боголенов Н. Н. Ультраструктура синапсов в норме и патологии. М., Медицина, 1975.

Поступила 23. IV. 1991

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.822.1.018:[547.95:547.943]015.1

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЭНКЕФАЛИНОБРАЗУЮЩЕЙ
КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н В ГИПОФИЗЕ, НАДПОЧЕЧНИКАХ
И СТРИАТУМЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИНСУЛИНА

ГРИГОРЬЯНЦ О. О., РОСТОВЦЕВ А. П., МАТВИЕНКО И. Н., ГОМАЗКОВ О. А.

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Регуляция биосинтеза энкефалинов может осуществляться при воздействии различных фармакологических агентов, таких как резерпин, никотин, форсколин, дексаметазон, инсулин [1—5]. Изменение уровня опиоидных пептидов и проэнкефалиновой мРНК при этих воздействиях свидетельствует о регуляции их биосинтеза ферментами процессинга. Карбоксипептидаза Н [К.Ф. 3.4.17.16] катализирует конечную стадию образования энкефалинов, входящих в одну из главных стресслимитирующих систем организма. Под воздействием инсулина в надпочечниках крыс изменялся уровень катехоламинов, энкефалинов и проэнкефалиновой мРНК [4], а также активность карбоксипептидазы Н и уровень мРНК прокарбоксипептидазы Н [6].

Целью настоящей работы было изучение региональной активности карбоксипептидазы Н в гипофизе, надпочечниках и стриатуме в динамике воздействия инсулина.

В работе использовали крыс-самцов линии *Wistar* массой 200 г; Dansyl-Phe-Leu-Arg («Calbiochem», США), индикаторные полоски на глюкозу «Dextrostix» («Ames», Франция), инсулин (завод мед. препаратов, г. Ленинград), остальные реактивы отечественного производства категории х.ч. Все растворы готовили на деионизованной воде.

Ткани, выделенные сразу после декапитации крыс, гомогенизировали в 10 мМ трис-НСI буфере рН 7,7, содержащем 0,25 М сахарозу. Готовили 2%-ный гомогенат для стриатума, 0,1%-ный—для гипофиза и 0,15%-ный—для мозгового слоя надпочечников. Разрушение тканей проводили на гомогенизаторе «VirTis» при 40 000g дважды по 30 с с минутными интервалами. Гомогенаты осветляли центрифугированием на микроцентрифуге «Eppendorf-5414» в течение 5 мин при 10 800g.

Активность карбоксипептидазы Н определяли по методу Fricker, Snyder [7] и вычисляли по разнице активностей с добавлением и без добавления Co^{2+} . Концентрацию белка определяли по методу Lowry и соавт. [8].

Инсулин вводили крысам подкожно в дозе 50 ед/кг массы. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Забой крыс проводили через 2 ч, 1, 4 и 7 суток после инъекции. В каждой группе находилось по 8 животных.

Экспериментальные результаты обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрическими методами.

С целью подбора эффективных доз инсулина определяли изменения уровня сахара крови у крыс, получавших от 1 до 50 ед препарата на кг массы тела. При введении инсулина в дозах от 1 до 10 ед/кг не наблюдали существенного снижения уровня сахара крови, а при введении 10, 25 и 50 ед/кг происходило резкое снижение уровня сахара с 7—8 до 1—3 мм в течение 1—2 ч с последующим постепенным восстановлением. Через 1 сутки уровень сахара соответствовал исходному. Изменения уровня сахара крови крыс в первые часы после инъекции инсулина представлены на рисунке. Ни одна из указанных доз не вызывала летального исхода. Для получения наиболее выраженного эффекта была выбрана рабочая доза инсулина 50 ед/кг.

Таблица

Изменение активности карбоксипептидазы Н после введения инсулина крысам

кань	Время после введения	Концентрация белка, мг/мл	Удельная активность, нмоль/мин·мг
Гипофиз	К	0,06±0,01	41,09±5,27
	2 ч	0,12±0,06	*31,5±4,45
	1 сутки	0,06±0,01	*51,31±4,87
	4 сутки	0,05±0,02	*70,22±8,34
	7 сутки	0,08±0,01	*2,91±4,18
Стриатум	К	1,01±0,10	1,63±0,07
	2 ч	1,16±0,36	1,89±0,32
	1 сутки	1,01±0,09	1,74±0,12
	4 сутки	1,01±0,12	1,63±0,06
	7 сутки	1,02±0,11	*1,43±0,04
Мозговой слой надпочечной коры	К	0,11±0,04	4,23±1,03
	2 ч	0,07±0,05	4,48±1,06
	1 сутки	0,1±0,03	3,25±0,33
	4 сутки	0,5±0,03	4,72±0,63
	7 сутки	0,10±0,03	*11,94±1,98

Примечание. *—достоверные различия с показанными в контроле ($p < 0.05$).

Изменения активности карбоксипептидазы Н в тканях крыс в динамике гипогликемического шока, вызванного инсулином, представлены в таблице. В гипофизе наблюдались фазные изменения величины У. А. карбоксипептидазы Н. Через 2 ч после инъекции инсулина

активность фермента достоверно снижалась на 23%, через 1 сутки—возросла на 24% по сравнению с контролем, к 4 суткам достигла максимального значения (171%). К 7 суткам активность фермента в гипофизе снизилась, однако превышала контрольный уровень на 29%. В стриатуме, в отличие от гипофиза, изменение величины У.А. карбоксипептидазы Н было выражено минимально. Достоверное снижение отмечалось только на 7 сутки (на 9%). В мозговом слое над-

Уровень
глюкозы, мм

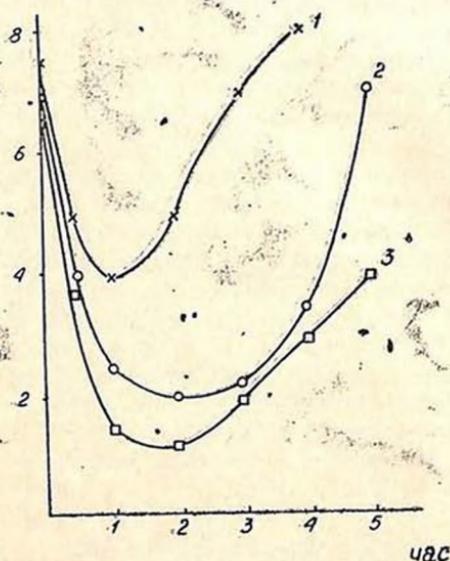


Рис. Изменение уровня сахара в крови крыс после инъекции инсулина. Дозы инсулина: 1—10 ед/кг; 2—25 ед/кг; 3—50 ед/кг.

почечников У.А. карбоксипептидазы Н на протяжении 4 суток не претерпевала значимых изменений, однако на 7 сутки после введения инсулина достоверно возросла на 182% по сравнению с контролем.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о различной динамике активности карбоксипептидазы Н в мозгу, гипофизе и надпочечниках после введения инсулина. Эти результаты совпадают с общей концепцией тканеспецифичности процессинга нейропептидов при различных физиологических и патологических состояниях в соответствии с выполняемой ими функцией [9]. Ранее мы наблюдали региональные изменения активности карбоксипептидазы Н при гравитационном стрессе, у крыс с агрессивным поведением, при алкогольной нагрузке [10—12]. Данные опытов с инсулином соответствуют общей закономерности таких сдвигов энкефалинообразующей активности в различных регионах.

Полученные здесь результаты можно также сопоставить с данными Kanamatsu и соавт. [4] об изменениях уровня энкефалинов,

энкефалинсодержащих пептидов и проэнкефалиновой мРНК в течение 7 суток после однократного воздействия на крыс инсулина. Динамика этих взаимосвязанных компонентов биогенеза энкефалинов может быть дополнена нашими результатами по изменению активности карбоксипептидазы Н. Полученные в 1990 г. данные Fricker и соавт. [6] об изменениях уровня мРНК прокарбоксипептидазы Н в надпочечниках под действием инсулина совпадают с полученными нами изменениями активности карбоксипептидазы Н.

Приведенные данные свидетельствуют о региональной специфичности изменений активности карбоксипептидазы Н, которые соответствуют участию энкефалиновой системы в изменениях функционального состояния организма.

ALTERATION OF ENKEPHALIN-FORMING CARBOXYPEPTIDASE H ACTIVITY IN PITUITARY, ADRENAL AND STRIATUM AT THE INSULIN STRESS

GRIGORIANTS O. O., ROSTOVITSEV A. P., MATVIENKO N. N.,
GOMAZKOV O. A.

Institute of Biological and Medical Chemistry, Moscow.

Regional carboxypeptidase H activity in rat pituitary, adrenal and striatum was studied at the dynamic of insulin stress during 7 days. Phase alterations were mentioned in pituitary: the 2 hours, followed by its increase that reach the maximal level at 4th day (+171%). Changes in striatum enzyme activity were minimally expressed. The increase of activity by 182% in adrenal medulla was obtained in 7th day. These data testify to regional peculiarities in the enzyme activity that correspond to participation of enkephalin system in the regulation of organism functional state.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hook V. Y. H., Eiden L. E., Pruss R. M. J. Biol. Chem., v. 260, № 10, p. 5991—5997, 1935.
2. Mocchetti I., Guidotti A., Schwarts J. P., Costa E. J. Neurosci., v. 5, № 12, p. 3379—3385, 1985.
3. Yoshikawa K., Sabol S. I. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 130, № 1, p. 1—10, 1986.
4. Kanamatsu T., Unsworth C. D., Ciliberto E. J., Jr., Viveros O. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 83, № 23, p. 9245—9249, 1986.
5. Hook V. Y. H., Eiden L. E. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 128, № 2, p. 563—570, 1985.
6. Fricker L. D., Rigual R. J., Diliberto E. J., Jr., Viveros O. H. J. Neurochem., v. 55, p. 451—467, 1990.
7. Fricker L. D., Snyder S. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 79, № 12, p. 3886—3890, 1982.

8. *Loxry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem. v. 193. № 1, p 265—275, 1951.
9. *Гомазков О. А., Григорьянц О. О.* Успехи совр. биол., т. 108, вып. 1, с. 109—124, 1989.
10. *Гомазков О. А., Ростовцев А. П., Комиссарова Н. В., Панфилов А. Д., Елистратова И. А., Фомин В. В.* Патол. физиол. эксперим. терап. № 5. с. 52—54, 1988.
11. *Гомазков О. А., Ростовцев А. П., Панфилов А. Д.* Нейрохимия, № 2, с. 215—226, 1989.
12. *Гомазков О. А., Панфилов А. Д., Ростовцев А. П., Комиссарова Н. В., Фомин В. В., Григорьянц О. О.* Вопр. мед. химии, № 4, с. 33—37, 1991.

Поступила 3. XII. 1991

УДК 612.397.8—014.3:577.12:612.67

ВЛИЯНИЕ СТРЕССА НА СОСТАВ И ПЕРЕКИСНОЕ
ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ
ГОЛОВНОГО МОЗГА ВЗРОСЛЫХ И СТАРЫХ КРЫС

ПОТАПЕНКО Р. И., САБКО В. Е.

Институт геронтологии, Киев

В настоящее время широко обсуждается вопрос о роли ПОЛ мембран в генезе нарушений метаболизма и функций разных органов, возникающих при моделировании патологических, в том числе стрессовых, состояний. Подчеркиваются особенности протекания процесса ПОЛ в этих условиях в ткани головного мозга в связи с особой ролью мозга в стрессовых ситуациях [1, 2]. Однако возрастной аспект этого вопроса не исследован. Между тем, возрастные изменения липидного состава мембран [3, 4] и процесса перекисидации [5, 6] могут существенно влиять на выраженность повреждений мембранных структур, ведущих к нарушению метаболизма и функции клеток при стрессе в старости. Поэтому представлялось важным изучить и сопоставить состав липидов и уровень их перекисидации в синаптических мембранах (СМ) нейронов головного мозга интактных крыс разного возраста и крыс, подвергавшихся стрессовому воздействию.

В работе использовали 7-месячных (взрослые) и 25-месячных (старые) крыс-самцов породы *Wistar*. С учетом возраста они были разделены на 4 группы (2 контрольные и 2 подопытные) по 10 крыс в каждой. Использовали модель эмоционально-болевого стресса (ЭБС) [7]. Крысы подвергались стресс-воздействию в течение 10 мин ежедневно на протяжении 3 суток. Синаптосомы выделяли из 10%-ного гомогената коры мозга на 0,32 М растворе сахарозы, содержащем 0,01 М трис и 0,005 М ЭДТА (рН 7,4) [8]. СМ получали, подвергнув синаптосомы гипотоническому шоку путем инкубации в дистиллированной воде (0°, 30 мин). Белок определяли модифицированным методом Lowry и соавт. [9], используя в качестве стандарта БСА. В липидных экстрактах (хлороформ/метанол, 1:2) [10] определяли холестерин [11], спектр жирных кислот (после метилирования) [12] на газожидкостном хроматографе «Shimadzu GC-4A» (Япония), суммарные и разделенные с помощью двумерной ТСХ на силикагеле в системах хлороформ/метанол/7N аммиак (90:54:11) и

хлороформ/метанол/уксусная кислота/вода (90:40:12:9) индивидуальные фосфолипиды—по P₁ [11]. В гептан-изопропаноловом экстракте определяли диевые конъюгаты [13]. Активность Na⁺, K⁺-АТФазы измеряли, как описано ранее [14].

Установлено, что СМ мозга старых крыс содержат больше холестерина, им присущи более высокое молярное отношение холестерин/фосфолипиды и коэффициент насыщенности жирнокислотных остатков липидов (таблица). Перечисленные изменения, ведущие к

Таблица

Липидный состав синаптических мембран коры головного мозга взрослых и старых крыс, интактных и подвергавшихся эмоционально-белевому воздействию. (M ± m; n = 10).

Показатели	Возраст крыс			
	7 месяцев		15 месяцев	
	контроль	опыт	контроль	опыт
Холестерин, мм л, мг (села)	260 ± 20	230 ± 30	260 ± 6*	390 ± 15**
Фосфолипиды, ммоль/мг белка	440 ± 20	470 ± 30	440 ± 30	490 ± 50
Холестерин/фосфолипиды	0,46 ± 0,03	0,51 ± 0,04	0,61 ± 0,04*	0,63 ± 0,07
Фосфолипидный состав (% P ₁):				
Фосфатидилхолин	45,3 ± 1,5	45,3 ± 2,1	41,6 ± 2,0	45,2 ± 2,2
Фосфатидилэтаноламин	37,6 ± 2,1	32,7 ± 2,0	37,7 ± 2,3	36,4 ± 2,4
Сфингомиелин	3,4 ± 0,3	5,2 ± 0,4**	4,0 ± 0,4	5,2 ± 0,5**
Фосфатидилсерин + фосфатидилинозит	10,8 ± 0,8	12,4 ± 0,9	13,4 ± 1,0*	7,8 ± 1,1**
Липиды сатидаглицерин	0,9 ± 0,1	0,7 ± 0,05	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,06
Лизофосфатидилинозит	0,5 ± 0,1	1,7 ± 0,2**	0,9 ± 0,1*	1,4 ± 0,2**
Фосфатидная кислота	1,4 ± 0,2	2,4 ± 0,2**	0,9 ± 0,2	2,3 ± 0,2**
Жирнокислотный состав (% С):				
14:0	0,50 ± 0,08	0,40 ± 0,08	0,30 ± 0,06	0,40 ± 0,03
16:0	28,1 ± 2,4	31,1 ± 1,3	30,9 ± 1,8	29,8 ± 1,5
17:0	0,40 ± 0,10	0,50 ± 0,08	0,40 ± 0,06	0,80 ± 0,10
18:0	26,3 ± 1,0	30,2 ± 0,3**	33,8 ± 1,5*	27,5 ± 0,9**
18:1	14,0 ± 1,6	19,7 ± 0,5**	18,2 ± 1,0*	19,4 ± 1,8
18:2	1,0 ± 0,2	0,60 ± 0,3**	0,60 ± 0,07*	0,70 ± 0,11
20:1 + 20:2	0,4 ± 0,08	0,30 ± 0,08	0,30 ± 0,05	0,40 ± 0,02
20:4 + 22:5	9,4 ± 1,3	7,9 ± 0,09	8,4 ± 0,8	8,6 ± 1,7
22:4	7,9 ± 1,1	3,4 ± 0,03**	3,1 ± 0,7*	3,9 ± 0,6
22:6	12,1 ± 1,8	6,0 ± 1,0**	4,1 ± 1,0*	8,6 ± 1,2**
Коэффициент насыщенности ЖК	1,24 ± 0,12	1,64 ± 0,09**	1,83 ± 0,22*	1,41 ± 0,11**

Примечание. Различия достоверны (p < 0,05): *—между взрослыми и старыми; **—между контрольными и подопытными крысами в каждой возрастной группе.

уплотнению СМ, возможно, в какой-то степени компенсируются увеличением концентрации мононенасыщенной кислоты (18:1) и лизофосфатидилхолина, которые должны способствовать уменьшению плотности упаковки ее компонентов.

ЭБС сопровождается активацией ПОЛ, на что указывает увеличение концентрации диеновых конъюгатов в СМ мозга взрослых (на 46%, с $1,03 \pm 0,07$ до $1,51 \pm 0,16$ нмоль/мг белка) и старых крыс (на 79%, с $0,75 \pm 0,07$ до $1,35 \pm 0,24$ нмоль/мг белка), изменением химического состава мембран. В СМ мозга подвергнутых стрессу взрослых крыс отношение холестерина/фосфолипиды по сравнению с интактными не изменяется, но растет уровень сфингомиелина, что в сочетании с увеличением насыщенности жирнокислотного спектра мембранных липидов будет способствовать изменению физических свойств СМ. Следствием этих сдвигов может быть изменение функционирования мембранных ферментов. Действительно, активность Na^+ , K^+ -АТФазы в СМ мозга взрослых крыс уменьшается по сравнению с контролем с $15,9 \pm 0,9$ до $11,9 \pm 0,7$ мкмоль P_i /мг белка. У старых крыс, подвергавшихся ЭБС, изменения в составе липидов СМ, наоборот, приводят к уменьшению степени насыщенности их жирнокислотного спектра в основном за счет снижения содержания стеариновой (18:0) кислоты и увеличения докозатетраеновой (22:4), а также к некоторому возрастанию уровней холестерина и сфингомиелина. Последние, как известно, способствуют увеличению вязкости мембраны. Активность Na^+ , K^+ -АТФазы в СМ мозга этих крыс также уменьшается по сравнению с интактными (с $14,2 \pm 1,1$ до $10,1 \pm 0,8$ мкмоль P_i /мг белка/ч). Стрессирование сопровождается ростом концентрации лизофосфатидилхолина и фосфатидной кислоты в СМ мозга крыс обеих возрастных групп, что может являться следствием усиления гидролиза фосфолипидов.

Таким образом, ЭБС сопровождается активацией ПОЛ СМ, более значительной у старых крыс, хотя уровень диеновых конъюгатов у опытных животных одинаков независимо от возраста. Изменения липидного состава СМ мозга, возникающие при стресс-реакции, носят как деструктивный, так и компенсаторный характер. Однако, если у взрослых животных перестройка СМ, происходящая под влиянием ЭБ-воздействия, должна в конечном итоге приводить к стабилизации и ослаблению процесса ПОЛ, то у старых крыс она может способствовать дальнейшей его активации вследствие увеличения количества полиеновых жирных кислот, являющихся основным субстратом ПОЛ, что, несомненно, будет усугублять повреждение синапсов. Однозначная интерпретация установленных фактов затруднительна, однако, если исходить из развиваемой Бурлаковой концепции [15] о регуляции липидного состава мембран посредством изменения активности перекисного окисления входящих в них липидов, можно предположить, что, либо в старости происходит нарушение этого регуляторного механизма, либо соответствующая перестройка СМ отсрочена во времени вследствие замедления метаболической адаптации.

COMPOSITION AND PEROXIDATION OF LIPIDS IN THE BRAIN SYNAPTIC MEMBRANES OF ADULT AND OLD RATS

POTAPENKO R. I., SABKO V. E.

Institute of Gerontology, Kiev

In 7- and 25-month-old male Wistar rats the emotional-pain stress was accompanied by the activation of lipid peroxidation in the synaptic membranes of the cerebral cortex, changes in lipid composition of the membranes, as well as by decrease of their Na^+ , K^+ -ATPase activity. In 7-month-old rats the stress reaction was characterized by the increase in saturation of fatty acid spectrum of the membrane lipids, while in 25-month-old rats the above saturation decreased. In animals of both age groups the stress modified the composition of phospholipids, in 25-month-old rats the rise of cholesterol level was observed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Мерсон Ф. Э., Архипенко Ю. В., Диденко В. В. Бюл. экперим. биол., т. 106, № 11, с. 542—544, 1988.
2. Никушкин П. В. Нейрохимия, т. 8, № 1, с. 124—145, 1989.
3. Фроликс В. В. Физiol. журн., т. 30, № 5, с. 559—566, 1984.
4. Потапенко Р. И., Сабко В. Е., Босацкая Л. П. Укр. биохим. журн., т. 62, № 5, с. 77—82, 1990.
5. Слагта О. Р. Чинский. Вopr. уз. Res. (совитин.), т. 78, p. 459—475, 1977.
6. Адуц А. Е., Паронян Ж. А., Априкян Г. В., Ахвердян Э. С. Нейрохимия, т. 4, № 4, с. 423—426, 1985.
7. Водяев Ф. П., Воробьева Т. М. — В кн.: Модели и механизмы эмоциональных стрессов, Киев, 1983.
8. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 455—459, 1975.
9. Markwell M. A. K., Haas S. M., Bieber L. L., Tolbert N. Anal. Biochem., v. 87, p. 206—210, 1978.
10. Кейтс М. — В кн.: Техника липидологии, М., Мир, 1975.
11. Виркемп Дж., Броукхьюз Р. — В кн.: Биохимическое исследование мембран (под ред. Э. Мэдди), М., Мир, 1979.
12. Методы биохимических исследований (под ред. М. И. Прохоровой), Л., Изд-во ЛГУ, 1982.
13. Костюк В. А., Потапович А. И., Лунец Е. Ф. Вopr. мед. химии, т. 30, № 4, с. 125—127, 1986.
14. Потапенко Р. И. Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 57—60, 1986.
15. Бурлакова Е. Б. Кардиология, т. 20, № 8, с. 48—52, 1980.

Поступила 28. III. 1991

УДК 577.15.07.157

ОТКРЫТИЕ ПЕПТИДИЛ-ЦИС-ТРАНС-ИЗОМЕРАЗЫ
В ГИПОТАЛАМУСЕ

(Новые его функции)

ГАЛОЯН А. А., ГУРВИЦ Б. Я.

Институт биохимии АН Армении

Ранее мы сообщили о выделении кальций-кальмодулинзамещающих пептидных системах гипоталамуса (ККЗПС). Они являются регуляторами активности кальмодулинзависимых ферментов (ФДЭ, сАМР, киназы легких цепей миелина и др.) без участия ионов кальция и кальмодулина [1]. К числу этих пептидов относится выделенный и идентифицированный нами тимозин β_4 (1—39). Его фрагменты 11—19, 25—31, 16—38, а также тимозин α_1 , пептид RF (С-модулин 1) [2—4] и полипептид EKAQGHPRQDENPY (фрагмент основного белка миелина) [5].

Первоначально при выделении С-модулинов из гипоталамического вторичного порошка (ГВП—3—4) системой ВЭЖХ на обращенных фазах (С₁₈, С₈) в градиенте ацетонитрила нами было установлено наличие 3-х зон. Из первой зоны были выделены С-модулины 1 и 3, а из II—С-модулин-3 или тимозин β_4 (1—39) [6].

Одна из биологически активных фракций, относящаяся к системе С-модулинов, выделенная нами из одной из трех основных зон активаторов ФДЭ [6], а именно, из зоны III, была нами подвергнута очистке до гомогенного состояния с помощью обратнoфазовой ВЭЖХ на колонке С-8 (Brownlee, aquapore RP-300, 4,6×220 мм). Элюцию С-модулинов осуществляли с помощью линейного градиента (20—50%) ацетонитрила, содержащего 0,08% трифторуксусной кислоты (ТФУ), против 0,1% ТФУ, со скоростью 0,5 мл/мин в течение 45 мин.

Вещество, выделенное при 42% ацетонитрила, подвергали секвенированию на секвенаторе фирмы «Кнаец», ФРГ. Оказалось, что первичная структура выделенного пептида представляет собой N-концевой фрагмент, совпадающий по аминокислотной последовательности со структурой пептидил-пролил-цис-транс-изомеразы (ЦТИ) быка и человека: NH₂Gly-Val-Glu-Val-Glu-Thr-Ile-Ser-Pro-Gly-Asp-Gly-Arg-Thr-Phe-Pro-Lys-Arg-Gly-Gln-Thr-Cys-Val-Val-His-Tyr-Thr-Gly-Asp-Leu.

ЦТИ относится к новому классу ферментов, отличающихся по

молекулярной массе, внутриклеточной локализации и субстратной специфичности. Впервые этот фермент был открыт в 1984 г. [7]. Он обнаружен практически во всех тканях и организмах, от млекопитающих до бактерий. Было показано, что ЦТИ катализирует цис-транс-изомеризацию пролина в коротких олигопептидах. Под действием этого фермента осуществляется поворот на 180° вокруг C-N-пептидной связи в месте присоединения пролина. В этом процессе не происходит ни разрыва пептидной связи, ни образования ковалентных связей. ЦТИ приписывают важнейшую роль в формировании оптимальной конформации белков, в частности, в ускорении определенной укладки вновь синтезированных пептидных цепей в клетке [8], которая предохраняет белок от протеолитического расщепления или нежелательной агрегации с другими компонентами клетки. Субстратами этого фермента, наряду с короткими пептидами, содержащими пролин, являются также некоторые белки, относительно которых было показано, что изомеризация пролина играет в них важную функциональную роль [9, 10]. В частности, это относится к рибонуклеазе, хмотрипсиногену и др.

Обнаружение того факта, что активность ЦТИ присуща циклофиллину [11, 12], явилось неожиданностью.

Циклофиллин впервые был выделен в 1984 г. как цитозольный белковый рецептор ($M_r \sim 18000$ Д) циклоспорина А—лекарственного соединения, широко используемого в медицинской практике для подавления отторжения трансплантата при различных операциях по пересадке органов и тканей [13]. Недавно было обнаружено, что соединение FK 506 обладает механизмом действия, подобным циклоспорино А, однако оно оказалось в 10—100 раз более эффективным иммуносупрессором по сравнению с циклоспорином А [14].

В опытах *in vitro* было показано, что циклоспорино А и FK 506 избирательно тормозят рост и дифференцировку Т-лимфоцитов на уровне транскрипции [15]. Несмотря на то, что соединения имеют различную структуру, они проявляют одинаковые механизмы действия, и их рецепторные белки обладают активностью ЦТИ. Это позволяет предположить, что в процессе торможения под действием данных иммуносупрессоров пролиферации Т-клетки участвует ЦТИ.

Следует, однако, отметить, что в настоящее время почти ничего не известно о ферментативных механизмах работы ЦТИ. Кроме того, несмотря на «настоящую революцию», которую совершили указанные иммуносупрессоры, а также некоторые другие подобные им лекарственные соединения в области трансплантации органов, биохимические механизмы их влияния на иммунную систему не ясны.

Тот факт, что иммунофиллины, в том числе и циклофиллин, обладающие активностью ЦТИ, являются связывающими белками для иммуносупрессоров различной структуры (циклоспорино А, FK-506, рапамцина), позволяет предположить наличие множества лигандов, способных вступать с ними во взаимодействие. В то же время, наличие ЦТИ во многих различных организмах свидетельствует о том,

что этот «вездесущий» фермент обладает важнейшими регуляторными функциями в клетке. Это подтверждается, например, тем, что упомянутый выше лиганд этого фермента—циклоспорин А, наряду с иммуносупрессорными свойствами, имеет большую терапевтическую ценность при лечении аутоиммунных нарушений, диабета, энцефаломиелиита и других болезней. Исследования биохимических функций этого соединения показали, что оно связывается с кальмодулином и ингибирует кальмодулин-активированную ФДЭ концентрационно-зависимым образом. Было высказано предположение о том, что в результате подобного связывания блокируется активация кальмодулин-зависимых ферментов, участвующих в различных процессах, в том числе и в процессе пролиферации Т-лимфоцитов и формирования иммунного ответа. Чувствительным к действию циклоспорина А является и Ca^{2+} -ионофор А 23187.

Не исключено, что ЦТИ также является кальмодулин-зависимым ферментом. Ca^{2+} -независимая активация кальмодулин-зависимых ферментов [3—6] под действием С-модулинов свидетельствует о существовании универсальной регуляторной системы, в которой участвуют ЦТИ и различные лиганды этого фермента.

Кроме того, кальмодулин-зависимые ферменты могут служить очень удобной моделью для изучения этой регуляторной системы, одной из функций которой является создание определенной конформации белков и пептидов в клетке *in vivo*, а также ускорение возврата к нативной конформации белков и пептидов, претерпевших нарушение структуры в системе *in vitro*.

Предстоит выяснить уникальную роль этого белка-фермента в процессе синтеза пептидных нейропептидов и в сложных механизмах метаболизма и функции нервных клеток.

THE DISCOVERY OF PEPTIDYL-CYS-TRANS-ISOMERASE IN HYPOTHALAMUS (its new functions)

GALOYAN A. A., GURVITS B. Ya.

Institute of Biochemistry Acad. Sci. of Armenia

From the bovine hypothalamus a polypeptide with C-modulin properties has been individually isolated on HPLC reverse phase (C_{18} , C_8) in acetonitrile gradient. By Edman degradation its primary structure has been determined which coincides with the structure of I—30 peptidyl-prolyl-cys-trans isomerase of bovine and human (immunodepressant receptors FK—506).

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Гураиц Б. Я. Нейрохимия, т. 5, с. 420—422, 1986.
2. Галоян А. А. Доклады АН Армении, т. 92, с. 172—176, 1991.
3. Ga'ouan A. A., Guravits B. Y., Shukriova L. A., Davis M. T., Shively J. E., Lee T. D. Neurochem. Res., v. 17, p. 773—777, 1992.
4. Ga'ouan A. A. Abstract for 23-d Annual Meeting of ASN p. 170, 1992.
5. Гураиц Б. Я., Алексанян С. С., Галоян А. А. Нейрохимия (в печати).
6. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гураиц Б. Я., Абрамян Г. Э. Нейрохимия, т. 8, № 1 с. 78—86 1989.
7. Fischer G., Bang H., Mech C. Biomed. biochem. acta, v. 43, p. 1101—1111, 1984.
8. Fischer G., Schmid F. X. Biochem., v. 2), p. 2205—2212, 1990.
9. Lang K., Schmid F., Fischer G. Nature, v. 329, p. 268—270, 1937.
10. Lin L. N., Hasum H., Brandts J. P. Biochim. et biophys. acta, v. 955, p. 256—265, 1988.
11. Takahashi N., Hayane T., Suzuki M. Nature, v. 337, p. 473—475, 1989.
12. Fischer G., Wittmann-Liebold B., Lang K., Kiefhaber T., Schmid F. X. Nature v. 337, p. 265—270, 1989.

Поступила 10. XII. 1991

The Biology of Nicotine dependence. Ciba Foundation Symposium 152. J. Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester, 280 p., 1990.

Биология никотиновой зависимости

Никотин является сильным препаратом, действующим на центральную нервную систему и оказывающим выраженные физиологические и психологические эффекты. Он считается основным фактором, вырабатывающим поведение курильщика табака и несет ответственность за поведенческие и физиологические реакции на вдыхаемый табачный дым. Предлагаемый сборник, охватывающий материалы 152-го симпозиума «Ciba Foundation», посвящен успехам в области идентификации никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в мозгу. Приемы молекулярной биологии, как указывается в книге, использовались для характеристики этих рецепторов и изучения их взаимодействия с никотином. Кроме того, в свете современных представлений о биологии никотина в мозгу, рассматривается роль никотина в формировании поведения курильщика. Книга предназначена для специалистов в области как прикладных, так и фундаментальных нейронаук.

T. Watanabe, H. Wada. Histaminergic Neurons: Morphology and Function. CRC Press, London, 1991, 432 p.

Гистаминергические нейроны: морфология и функция.

Книга посвящена исследованиям в области нейронаук, анатомии, фармакологии, биохимии и медицины. В ней обозревается система гистаминергических нейронов мозга. В числе рассматриваемых вопросов—биохимия ферментов, гистаминовые рецепторы (H_1 , H_2 и H_3), морфология, сосуществование и развитие системы гистаминергических нейронов, электрофизиологические исследования нейронов позвоночных и беспозвоночных, функции гистаминергических нейронов.

Книга состоит из следующих глав: «Ферменты, участвующие в обмене гистамина», «Определение гистамина и его метаболитов в мозгу», «Третий гистаминовый рецептор», «Изучение морфологии гистаминергических нейронов с помощью маркера—гистидиндекарбоксилазы», «Использование антисыворотки к гистамину для выявления системы гистаминергических нейронов», «Контакты гистаминергических нейронов афферентных и эфферентных пучков в мозгу крыс; сопоставление с допаминергической, порадренергической и серотонинергической системами», «Электрофизиологическое изучение гистаминергических и гистаминоподобных нейронов позвоночных», «Гистамин как трансмиттер у беспозвоночных—исследование на идентифицированных клетках в *Aplysia*», «Изучение функции гистаминергических нейронов с помощью фторметилгистидиновой пробы», «Гистаминергическая регуляция нейроэндокринной системы», «Вовлечение гистамина в циркадные и другие ритмы», «Обмен гистамина в мозгу млекопитающих», «Гистамин в сетчатой оболочке глаза». Книга завершается исчерпывающим списком эффектов, наблюдаемых при центральном введении гистамина и родственных соединений и перечнем новейших успехов в изучении системы гистаминергических нейронов.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я. Нейрохимия, т. 5, с. 420—422, 1986.
2. Галоян А. А. Доклады АН Армении, т. 92, с. 172—176, 1991.
3. Ga'ouan A. A., Gurvits B. Y., Shul'tova L. A., Davis M. T., Shively J. E., Lee T. D. Neurochem. Res., v. 17, p. 773—777, 1992.
4. Ga'ouan A. A. Abstract for 23-d Annual Meeting of ASN p. 170, 1992.
5. Гурвиц Б. Я., Алексанян С. С., Галоян А. А. Нейрохимия (в печати).
6. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Абрамян Г. Э. Нейрохимия, т. 8, № 1 с. 78—86 1989.
7. Fischer G., Bang H., Mech C. Biomed. biochem. acta, v. 43, p. 1101—1111, 1984.
8. Fischer G., Schmid F. X. Biochem., v. 2), p. 2205—2212, 1990.
9. Lang K., Schmid F., Fischer G. Nature, v. 329, p. 268—270, 1937.
10. Lin L. N., Hasum H., Brandts J. P. Biochim. et biophys. acta, v. 955, p. 256—265, 1988.
11. Takahashi N., Hayane T., Suzuki M. Nature, v. 337, p. 473—475, 1989.
12. Fischer G., Wittmann-Liebold B., Lang K., Kiefhaber T., Schmid F. X. Nature v. 337, p. 265—270, 1989.

Поступила 10. XII. 1991

The Biology of Nicotine dependence. Ciba Foundation Symposium 152. J. Wiley and Sons, Baffins Lane, Chichester, 280 p., 1990.

Биология никотиновой зависимости

Никотин является сильным препаратом, действующим на центральную нервную систему и оказывающим выраженные физиологические и психологические эффекты. Он считается основным фактором, вырабатывающим поведение курильщика табака и несет ответственность за поведенческие и физиологические реакции на вдыхаемый табачный дым. Предлагаемый сборник, охватывающий материалы 152-го симпозиума «Ciba Foundation», посвящен успехам в области идентификации никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в мозгу. Приемы молекулярной биологии, как указывается в книге, использовались для характеристики этих рецепторов и изучения их взаимодействия с никотином. Кроме того, в свете современных представлений о биологии никотина в мозгу, рассматривается роль никотина в формировании поведения курильщика. Книга предназначена для специалистов в области как прикладных, так и фундаментальных нейронаук.

РОЛЬ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В МЕХАНИЗМАХ
ДЕЙСТВИЯ НАРКОТИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ

СЕРГЕЕВА М. Г., ЛЕЩЕНКО З. В., КУЛИКОВ В. В., ВАРФОЛОМЕЕВ С. Д.

Институт физической и химической биологии

им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова

В обзоре впервые проведен анализ литературных данных, свидетельствующих о возможности взаимодействия иммунной и нервной систем на молекулярном уровне при введении в организм наркотических веществ: морфина, кокаина, марихуаны и каннабиноидов, барбитуратов и других. На основе проведенного анализа выдвинута гипотеза о существовании тесной связи иммунной и нервной систем в развитии явлений зависимости и абстиненции. Высказано предположение, что реакция иммунной системы не зависит от типа вводимого наркотика.

С начала 80-х годов начались интенсивные исследования взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем на молекулярном уровне [1—3]. Показано, что секретируемые НС нейропептиды и нейромедиаторы влияют на функции иммунной системы в опытах *in vivo* и *in vitro*, причем эффекты этих веществ взаимозависимы с действием различных негормональных гормонов эндокринной системы [1—4] (рисунок).

Иммунная, нервная и эндокринная системы относятся к основным системам поддержания гомеостаза организма, им свойственна саморегуляция всех функций. Обязательный компонент каждого процесса саморегуляции—обратная связь, которая позволяет непрерывно корректировать гомеостатические реакции. Поэтому, помимо изучения нейромодуляторов иммунной системы, ведутся интенсивные исследования веществ, секретируемых иммунокомпетентными клетками и влияющих на функции НС [1—3]. Эти вещества могут быть не только регуляторами НС по принципу «обратной связи», но и выполнять функции «информаторов». Так, при ответе на введенный в организм антиген происходит обмен мессенджерами между циркулирующими иммунокомпетентными клетками и мозгом, происходит модификация функций мозга [5], в частности, увеличение электрической активности отдельных нейронов в определенных частях гипоталамуса [6], а также изменяется метаболизм норадреналина в гипоталамусе [5]. Таким образом, иммунную систему можно рассматривать как еще один сенсорный механизм [2] (рисунок). Иммунокомпетентные клетки получают информацию от попадающих в

кровь антигенов бактерий и вирусов, лекарственных препаратов, различных веществ, всасываемых из кишечника и т. д., сигнал обрабатывается клетками крови и передается в ЦНС.

Взаимосвязи нервной, эндокринной и иммунной систем наиболее ярко проявляются при установлении новых гомеостатических уровней, возникающих при различных патологических состояниях, связанных со старением [7], длительном воздействии стрессирующих условий [8], употреблении наркотических веществ [9]. Для всех

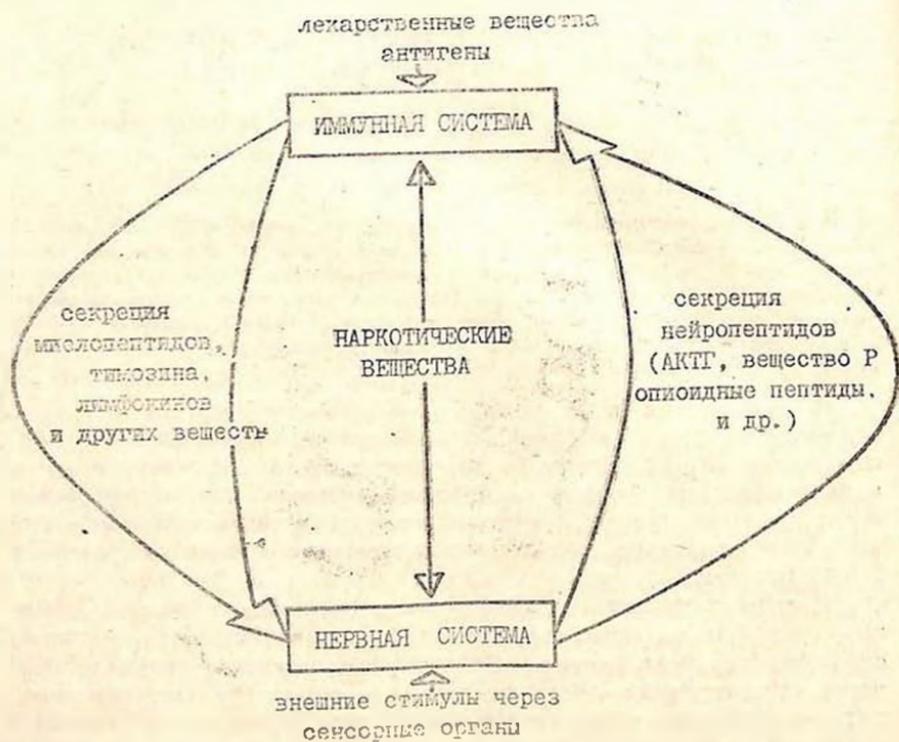


Рис. Способы передачи информации между иммунной и нервной системами

этих процессов характерны такие общие явления, как изменение секреции простаноидов, опиоидных пептидов, глюкокортикоидов и других гормонов [7—10].

В обзоре далее приведены данные об изменении функций иммунной системы при длительном введении наркотических веществ *in vivo*, эффекты этих веществ на иммуокомпетентные клетки в опытах *in vitro*. Проведен анализ возможностей реализации взаимосвязей иммунной и нервной систем при введении в организм наркотических веществ, вызывающих при длительном их употреблении явления зависимости.

В 1976 г. было показано, что при остром внутривенном, внутримышечном или внутрибрюшинном введении энкефалины не имеют ярко выраженной анальгетической активности. Однако при длительном введении они проявляют активность как транквилизаторы, антидепрессанты и антиконвульсанты [11]. Пытаясь объяснить эти явления, авторы выдвинули предположение, что наблюдаемые эффекты опосредуются влиянием энкефалинов на иммунокомпетентные клетки. Этой работой открыта, на наш взгляд, наиболее интригующая проблема в области исследований взаимосвязи иммунной и нервной систем.

Энкефалины и эндорфины—эндогенные опиоидные пептиды, имеют сродство к тем же рецепторам, с которыми связывается экзогенный морфин и его аналоги [12]. Но если экзогенные наркотические вещества могут оказывать влияние на клетки иммунной системы, т. е. в свою очередь, реагировать на эти сигналы и посылать информацию в ЦНС, то заманчиво предположить, что определенные поведенческие и другие функции ЦНС формируются при непосредственном участии иммунной системы. Интересной является проблема участия системы иммунитета в возникновении зависимости при действии экзогенных веществ наркотического ряда: морфина и героина, марихуаны и каннабиноидов, барбитуратов, бензодиазепиновых лигандов, кокаина и др., так как при длительном употреблении этих веществ происходит установление нового гомеостатического состояния, то есть возникает новый уровень взаимосвязей нервной, эндокринной и иммунной систем.

Вещества наркотического ряда влияют на функции иммунной системы при длительном их введении в организм. Общеизвестно, что наркоманы значительно больше других людей подвержены различным заболеваниям, менее устойчивы к инфекционным болезням. У них происходит общее изменение иммунной системы. Так, у героинового наркомана идет депрессия функции ответа лимфоцитов на митогены, меняется количество Т- и нуль-лимфоцитов в периферической крови, уменьшаются фагоцитирующие свойства мононуклеаров и способность к «дыхательному взрыву» нейтрофилов [13]. Употребление наркотических веществ других классов (барбитураты, алкоголь, диазепам, каннабиноиды, кокаин) также приводит к значительным изменениям свойств клеток иммунной системы, главным образом, в отношении иммуносупрессии [13]. Очевидно, что все эти вещества на иммунокомпетентные клетки либо при непосредственном влиянии либо из-за «вторичных» влияний измененной нервной системы на иммунную.

В настоящее время показано, что экспериментальная модуляция иммунной системы приводит к изменениям в развитии процессов зависимости и абстиненции [14—18]. На проявление абстинентного синдрома при отмене длительно вводимого морфина или введения его антагониста налоксона влияют различные иммуномодуляторы: α -интерферон, циклоспорин А [14], кортизол, циклофосфамид [15], тафини, γ -облучение [16]. Во всех случаях подавление иммунной системы приводит к ослаблению абстинентного синдрома [14—16]. Эти иммуномодуляторы меняют также электрофизиологический ответ мозга у контрольных и морфинзависимых животных [17]. При введении морфинзависимым животным циклоспорина А за 2 ч до введения налоксона, происходит ослабление синдромов абстиненции [18], вызванных антагонистом. Если ввести циклоспорин А контрольным животным, то через 24 ч их мононуклеарные клетки из селезенки способны оказывать тот же эффект на морфинзависимых животных, что и прямое введение циклоспорина за 2 ч до введения налоксона [18]. Очевидно, что циклоспорин влияет на ЦНС непосредственно и непрямым образом, через влияние на иммунокомпетентные клетки. Возможно, что влияние циклоспорина опосредуется какими-либо веществами, секретлируемыми клетками иммунной системы, и разница в эффектах связана с накоплением эффективной концентрации этих веществ в организме.

Все эти результаты подтверждают предположение, что установление зависимости от наркотика, хотя бы частично, идет через модулирование иммунной системы [14, 19, 20].

α -Интерферон, тафини, γ -облучение, мурамилловые дицетиловы обладают общим свойством влиять на функции макрофагов [17]. При этом повышается синтез таких соединений, как интерлейкин I, простагландины, которые сами оказывают влияние на действие опиатов, включая изменение степени абстиненции и модулирование связывания опиатов с рецепторами [21]. На основании этих данных было высказано предположение, что активация макрофагов воздействует на изменение функции опиатов и опиоидных пептидов [17]. Кроме того, при введении животным указанных выше иммуномодуляторов отмечено проникновение в ЦНС клеток макрофагального типа [22], что расширяет возможности передачи сигналов с иммунной системы в ЦНС. Кроме того, что иммуномодуляторы влияют на синдром абстиненции, они по-разному воздействуют на другие проявления действия опиатов: α -интерферон меняет индукцию толерантности к опиатам [23], а γ -облучение и циклоспорин А меняют влияние опиоидов при антиопиоидности [17]. Все это говорит о множественности процессов участия иммунной системы в регуляции действия опиоидов.

В настоящее время не ясен механизм участия иммунной системы в эффектах, возникающих в организме при длительном введении наркотических веществ различных классов. Очевидно, однако, что иммунная система принимает непосредственное участие в установлении при этом нового гомеостатического состояния организма.

На иммунокомпетентных клетках существуют специфические рецепторы к наркотическим веществам.

Взаимосвязь иммунной и нервной систем может происходить при наличии рецепторов для мессенджеров на поверхности иммунокомпетентных клеток, а также способности этих клеток реагировать на сигнал. В настоящее время показано, что на клетках иммунной системы имеются различные рецепторы к нейропептидам и нейромедиаторам, в том числе опиатные [24], бензодиазепиновые [25], серотониновые [26], аденозиновые [27] и другие [28]. Величины K_d лиганд-рецепторных комплексов лежат в пико- и наномолярной области и число центров связывания составляет от нескольких сотен до нескольких тысяч на клетку [24, 29]. Для рецепторов иммунокомпетентных клеток характерны отличия от рецепторов НС в отношении к лигандам, которые позволяют относить их к рецепторам особого периферического типа [28, 29], которые, как правило, гетерогенны. Например, различают эффекты эндогенных опиоидных пептидов, проявляющихся вследствие активации «классических» опиатных рецепторов (эффект обратим антагонистом налоксоном) и «неопиатных» мест связывания, где налоксон не влияет на эффект или действует как частичный агонист [12]. Характеристики связывания нейропептидов и гормонов подробно освещены в специальных обзорах по рецепторам этих лигандов на лимфоцитах [29]. Следует отметить, что огромный интерес к исследованиям рецепторов на иммунокомпетентных клетках вызван следующими причинами: 1) существование таких рецепторов подразумевает наличие специфических связей между иммунной, нервной и эндокринной системами; 2) число рецепторов к гормонам на этих клетках резко меняется при активации антигенами и митогенами [30, 31], а также при различных заболеваниях (это стимулирует исследования с целью разработки диагностики различных заболеваний по изменению рецепторов на поверхности клеток крови); 3) фармакологические характеристики этих рецепторов служат предпосылкой для разработки лекарственных веществ нового класса.

Одна из проблем изучения влияния нейропептидов и нейромедиаторов на функции иммунной системы заключается в том, что в классических методах исследования иммунных функций *in vitro* используют обычно смешанные популяции лимфоцитов. Однако известно [32], что каждой из этих популяций клеток могут быть свойственны рецепторы с различными характеристиками. Возможно, этим объясняется большая разница в индивидуальной восприимчи-

восте к воздействию нейропептидов в опытах с периферической кровью человека [33, 34], а также различная восприимчивость к введению наркотических веществ *in vivo*.

Морфин взаимодействует с опиатными рецепторами, расположенными на иммунокомпетентных клетках практически всех типов [24]. Галлюциногены, типа ЛСД, многие нейролентики и антидепрессанты взаимодействуют с серотониновыми рецепторами мозга [35], но, циркулируя в крови, могут взаимодействовать с серотониновыми рецепторами клеток крови, которые обладают сходными с рецепторами мозга родством к лигандам [35]. Аналогичные данные известны для производных серотонина β -карболинов [36]. β -Карболины обладают психотропным воздействием, имеют родство к бензодиазепиновым рецепторам. Хроническая обработка животных кофеином и отмена его приводит к изменению уровня циркулирующего в крови аденозина и аденозиновых рецепторов на клетках крови [37]. Таким образом, рассмотренные наркотические вещества имеют специфические рецепторы на иммунокомпетентных клетках, что может свидетельствовать об их участии в регуляторных механизмах иммунной системы.

В реализации трансмембранных сигналов рецепторов в иммунокомпетентных клетках задействованы вторичные мессенджеры. Так, к повышению концентрации внутриклеточного сАМР приводит активация аденозиновых (R_a или A_2), β -адренергических, гистаминовых (H_2), вазопрессиновых рецепторов, а также действие простагландинов, глюкокортикоидов [38]. Активация мускариновых, серотониновых [38], а также, вероятно, опиатных рецепторов [39], приводит к ингибированию активности аденилатциклазы и снижению концентрации внутриклеточного сАМР. Вероятнее всего, как и на клетках нервной ткани, в проведении трансмембранного сигнала задействованы не только активация (или ингибирование) одной системы вторичных мессенджеров, но и все возможные пути регуляции внутриклеточных процессов. Показано, в частности, участие бензодиазепиновых рецепторов в активации Ca^{2+} -каналов на лимфоцитах, во влиянии на синтез арахидоновой кислоты [40]. Как и на других типах клеток, сигнал с рецептора на системы вторичных мессенджеров лимфоцитов и моноцитов передается через GTP-связывающие белки (G-белки). Исследования роли внутриклеточных мессенджеров в регуляции роста и дифференцировки лимфоцитов начались в начале 70-х годов, и в настоящее время эта тема хорошо освещена в многочисленных обзорах [38, 41]. Показано, что в процессах активации лимфоцитов, пролиферации и дифференцировки важна деятельность Ca^{2+} -каналов, сАМР, сGMP, полиаминов, инозитолфосфатного пути. Так, сАМР стимулирует дифференцировку лимфоцитов, а сGMP—их пролиферацию [38]. Кроме того, сАМР является внутриклеточным мессенджером для интерлейкина 1 [42], участвует в проведении сигнала интерлейкина 2 [43] и играет ключевую роль в продукции антител В-клетками при стимуляции ин-

терлейкинами [44]. Показано также, что способность различных веществ ингибировать респираторный взрыв нейтрофилов и макрофагов коррелирует с их способностью активировать аденилатциклазу [45].

Таким образом, через специфические рецепторы наркотические вещества активируют различные системы вторичных мессенджеров и могут принимать участие в тонкой регуляции разнообразных функций иммунной системы.

Изменения функций иммунной системы при введении наркотических веществ in vitro.

В опытах *in vitro* показано, что наркотические вещества оказывают прямое влияние на иммунокомпетентные клетки через специфические рецепторы. Часть этих данных суммирована в таблице, из которой видно, что морфин оказывает общий ингибирующий эффект на функции клеток иммунной системы: снижает уровень пролиферации митогенстимулированных лимфоцитов [34, 49, 68], цитотоксичность НК (природные киллеры) клеток [58], уровень интерферона в крови [61], ингибирует респираторный взрыв и приводит к снижению фагоцитоза [59].

Также отрицательно влияют на функции клеток иммунной системы и каннабиноиды—активные компоненты марихуаны. Они ингибируют секрецию интерферона иммунокомпетентными клетками, также функции макрофагов, как миграция и фагоцитоз, пролиферацию митогенстимулированных Т- и В-лимфоцитов, продукцию антител и другие [47, 50, 53]. Действие дельта-9-тетрагидроканнабинола (ТГК)—наиболее активного компонента марихуаны, связывают с его ингибирующим влиянием на синтез и функции интерлейкина 2 [69].

Эффекты каннабиноидов тесно связаны также с простагландинами. Введение лигандов этого класса повышает концентрацию простагландинов в различных системах [70]. Ингибиторы синтеза простагландинов уменьшают специфический эффект каннабиноидов [71]. Кроме того, предварительная иммунизация мышей простагландин E_2 -конъюгатами приводит к значительному снижению каталептического ответа животных на введение ТГК [72]. Поэтому авторы [72] предположили, что ТГК активирует простагландин E_2 (или другие соединения этого ряда) из периферических источников, которые попадают в мозг и участвуют в проявлении некоторых эффектов ТГК.

Барбитураты при введении *in vivo* также приводят к иммуносупрессии [73]. Известно, что в опытах *in vitro* они ингибируют пролиферацию лимфоцитов [74]. Spiers и соавт. [74] связывают обнаруженные эффекты с влиянием этих лигандов на секрецию интерлейкина 2 и его связывание. Степень супрессии митогенстимулированной пролиферации лимфоцитов различными барбитуратами кор-

релирует с их эффектами в ЦНС и обратно пропорциональна времени их выведения из крови [74].

Возможные механизмы изменения модуляции функций иммунной системы наркотическими веществами.

Особую роль в реализации эффектов наркотических веществ, несомненно, играют моноциты и макрофаги (таблица). Так, диазепин

Таблица

Влияние веществ наркотического ряда на функции иммунной системы				
Вещество \ Функция	Морфин	Каннабиноиды, марихуана	Кокаин	Бензодиазепины
Число Т-клеток от общего числа лимфоцитов	- [6]		- [64, 6]	
Устойчивость к инфекциям	- [1]	- [1]	- [67]	
Пролиферация РНА	[3, 65]	[30, ...]	⊙ [65]	⊙ [13]
Сол А	- [48]	- [5]		- [13]
LPS	- [19]	- [1]		- [2]
другие	- [45]	- [1]		
НК-активность, цитотоксичность	- [34]	- [1]		
Хемотаксис, фагоцитоз, респираторный взрыв	- [5]	- [5]	- [62]	
Уровень антител	- [59, 60]	- [1]	+ [63]	
Секреция простагландинов	- [5]	- [5]	- [64]	+ [40]
Секреция лимфокинов, интерферонов	+ [9]	+ [13]	- [64, 65]	- [29]
Изменение веса органов иммунной системы <i>in vivo</i>		[65]	+ [66]	+ [13]
Гост опухолей	- [1]	- [5]	- [64]	- [54]
	+ [1]		+ [1]	

Примечание. — — угнетение; + — стимуляция; ⊙ — влияния нет.

нам (бензодиазепиновые рецепторы) в концентрации 10 мМ (что соответствует его сродству к рецепторам) значительно увеличивает ответ макрофагов при их стимуляции арахидоновой кислотой [40]. Следует отметить, что макрофаги — особое место действия для бензодиазепиновых лигандов, так как на всех других тканях периферические бензодиазепины действуют в микромолярных концентрациях. Функции макрофагов модулируют также опиоиды [75, 59, 76]. Морфин ингибирует респираторный взрыв на стимулированных моноцитах и снижает фагоцитоз макрофагов [59, 75]. Опиоидные пептиды влияют на организацию микрофиламентов моноцитов [76]. Моноциты и макрофаги играют ключевую роль в активации иммунных ответов, ими секретируются интерлейкин 1 и простагландин группы E [77]. Возможно, именно через эти клетки и эти секретируемые вещества осуществляется участие иммунной системы в реализации эффектов наркотических веществ.

Нельзя исключить и вероятность участия эндогенных опиоидных пептидов в возникновении эффектов иммунной системы при

длительном введении наркотических веществ. Показано, что у наркоманов, употребляющих героин, при абстиненции происходит повышение уровня β -эндорфина в плазме [78] и введение кокаина [79], клоидина [80], амфетамина [81] и других наркотических веществ [82] приводит к тем же результатам.

Хотя функции циркулирующих в плазме опиоидных пептидов точно неизвестны, предполагают, что они могут участвовать в иммуносупрессии, связанной, например, со стрессом [8]. При введении наркотических веществ изменяются концентрации не только опиоидных пептидов, но и других иммуномодуляторов. Так, длительное введение диазепама приводит к увеличению концентрации лигандов типа β -карболинов [27], а также меняют уровень кортикостерона [83] и норадреналина [84] в плазме. В то же время известно, что эти лиганды регулируют функции иммунной системы [85].

Регуляция эффектов наркотических веществ может осуществляться через тонкую регуляцию экспрессии рецепторов на поверхности клеток и их десенситизацию. О влиянии психотропных веществ наркотического ряда на внутриклеточные механизмы иммунокомпетентных клеток известно еще немного, но существует определенное сходство в действии наркотических веществ на внутриклеточные механизмы: влияние на выброс арахидоновой кислоты, ингибирование аденилатциклазы, регуляция ионных K^+ -каналов и метаболизма фосфоинозита. В проведении сигнала с рецепторов на эти внутриклеточные мессенджеры участвуют G-белки, с которыми связаны эффекты интерлейкинов 1, 2 и простагландинов [86]. Возможно, что изменения при введении наркотических веществ α субъединиц этих G-белков (α_{1-13} , α_0) приводят к изменениям функций иммунной системы, отмеченных в таблице.

Сходство между внутриклеточными процессами при активации различных рецепторов может приводить к единым изменениям в реакции клеток иммунной системы на введение в кровь психотропных препаратов наркотического ряда. Таким образом, влияние наркотических веществ может проявляться в изменении многих функций иммунокомпетентных клеток (таблица), а также в изменении концентраций интерлейкинов и простагландинов [70], эндогенных опиоидных пептидов [78—82] и других веществ [83, 84]. Все эти вещества могут передавать сигналы от иммунной системы к нервной.

Участие веществ, секретируемых клетками иммунной системы, в регуляции функций нервной системы.

Как может передаваться информация от измененных иммунокомпетентных клеток в ЦНС? Например, через сигналы нейрональных систем лимфоидных тканей (электрические импульсы или обратный транспорт веществ-передатчиков по аксону), через иммунокомпетентные клетки, проходящие при определенных условиях через ГЭБ и вступающие в непосредственный контакт с клетками

мозга, а также через вещества, секретируемые клетками при развитии иммунного ответа. Какие же это вещества?

Во-первых, иммунокомпетентные клетки секретируют адренокортикотропный гормон, опиоидные пептиды, соматостатин, VIP, вещество Р и другие вещества [87], способные частично преодолевать ГЭБ и взаимодействовать с рецепторами нейромедиаторов и нейротрансмиттеров мозга.

Во-вторых, способностью влиять на ЦНС обладают миелинопептиды, продуцируемые клетками костного мозга, тимозин, вырабатываемый в вилочковой железе, и другие вещества, секретируемые иммунокомпетентными клетками (рисунок).

В-третьих, накоплено много доказательств, что лимфокины и другие вещества, секретируемые клетками иммунной системы и участвующие в регуляции собственно иммунных функций, способны оказывать различное воздействие на клетки ЦНС [87, 88]. Различные интерлейкины (IL-1, IL-2, IL-6), интерферон, TNF- α влияют в экспериментах *in vivo* и *in vitro* на взаимосвязь гипоталамус-гипофиз-надпочечники [88, 98]. Показано, что в ЦНС происходит синтез различных интерлейкинов и экспрессия соответствующих рецепторов [96]. Интерлейкин 1 продуцируется глиальными клетками и связывается с клетками гипоталамуса [97]. Имеются данные, что интерлейкин 1 активирует опиатные рецепторы ЦНС [91]. Существует гипотеза, что сонливость и анальгезия, наблюдающиеся при лихорадке, связаны с влиянием интерлейкина 1 непосредственно на взаимодействие опиоидных эндогенных пептидов с опиатными рецепторами мозга [88, 93]. Показано, однако, что в определенных участках мозга существуют специфические рецепторы к интерлейкину 1, и концентрация их достаточно высока [94]. Показана также тесная связь между эффектами при действии интерлейкина 2 на *locus coeruleus* и стимуляцией там опиатных рецепторов [95]. Гипотезы, что эффекты интерлейкинов 1, 2 и простагландинов на ЦНС связаны именно с модуляцией опиатных рецепторов [88, 92, 93, 95], требуют тщательного изучения. Известно, что интерлейкин 1—многофункциональный белок, который не только участвует в регуляции иммунного ответа, но влияет на нейтрофилы, эпителиальные и эндотелиальные клетки, гистациты, астроциты, клетки гипофиза [91]. Установлено также его влияние на синтез простагландинов по неизвестным пока механизмам [90]. В то же время, простагландин E₂ является одним из основных эндогенных регуляторов синтеза и секреции интерлейкина 1 [89]. Таким образом, существует тесная взаимосвязь между интерлейкинами, эндогенными опиоидными пептидами, простагландинами, и все эти вещества могут передавать сигналы от иммунной системы к нервной.

Заключение

Выявление сходства и различий между действием наркотических веществ на функции иммунной системы, секрецию лимфокинов

и простаноидов затрудняется отсутствием единых количественных методов тестирования функций иммунокомпетентных клеток, а также множественностью влияния этих веществ на клетки и тонкой регуляцией возникающих эффектов [34]. Однако анализ литературы показывает, что иммунная система может влиять на нервную через ряд веществ, в первую очередь, через лимфокины и простагландины, а также через собственную секрецию нейропептидов. Секреция эта происходит в незначительных количествах, однако в процессе движения через капилляры мозга иммунокомпетентная клетка может создавать высокую локальную концентрацию секретируемого вещества, достаточную для проникновения в мозг и регуляции его функций. Вещества наркотического ряда влияют на функции иммунной системы. Эти изменения происходят при длительном введении веществ *in vivo*, а также в опытах *in vitro*. Модуляция функций иммунной системы приводит к изменениям в ответах НС на введение наркотиков, что позволяет говорить о существовании связи иммунной и нервной систем в реализации эффектов организма при развитии зависимости и абстиненции. Имеется большое сходство в эффектах наркотических веществ на функции иммунной системы (таблица), что может объясняться сходством действия их на внутриклеточные механизмы. При непосредственном влиянии наркотиков на иммунокомпетентные клетки (*in vitro*) происходит секреция интерлейкинов и простагландинов, которые, в свою очередь, могут участвовать в регуляции функций НС. Заинтересовано предположить, что при введении наркотиков любого типа иммунная система реагирует однотипно, а разница в эффектах наркотиков проявляется только на уровне прямого взаимодействия наркотических веществ с клетками мозга. Наличие некоего неспецифического процесса в возникновении зависимости от наркотика подтверждается и фактами легкого перехода с одного вещества на другое людьми, злоупотребляющими наркотиками [9]. Таким образом, обоснованным является представление о том, что иммунная система играет важную роль в реализации именно неспецифических процессов, возникающих при длительном введении наркотиков, а именно, собственно явлений зависимости—установлении нового уровня гомеостаза.

Авторы выражают благодарность академику АМН СССР И. П. Ашмарину за ценные замечания, высказанные при обсуждении.

THE ROLE OF IMMUNE SYSTEM IN THE MECHANISMS OF DRUG ACTION

SERGEeva M. G., LESHCHENKO Z. V., [KULIKOV V. V.],
VARFOLOMEEV S. D.

A. N. Belozersky Institute of Physico-chemical Biology, Moscow
Moscow State University.

This review attempts to consolidate the data on probable interaction of immune and nervous systems caused by administration of narcotics:

morphine, cocaine, marijuana and cannabinoids, barbiturates and others. Based on these data the hypothesis was advanced that immune and nervous systems interact closely in development of drug dependence and abstinence symptoms. It is also suggested that immune system response is not depend on the type of the administered drugs.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Morley J. E., Kay N., Sotomayor G. F., Pomonoy N. P. *Life Sci.*, v. 41, № 5, p. 527-544, 1987.
2. Blalock J. E. *J. Immunol.*, v. 132, № 3, p. 1957-1970, 1984.
3. Besedovsky H. O., Del Rey A. E., Sorkin E. *Immunol. today*, v. 4, № 12, p. 342-36, 1983.
4. Felten D. L., Felten S. Y., Carlson S. L. *J. Immunol.*, v. 135, (2 Suppl.), p. 755S-765S, 1985.
5. Besedovsky H., Del Rey A., Sorkin E. *Science*, v. 221, p. 564-566, 1983.
6. Saphier D., Abramsky O., Mor G., O'adia H. *Brain Behav. Immun.*, v. 1, p. 40-51, 1987.
7. Дильман В. М. Четыре модели медицины, Л., Медицина, Ленинградское отделение, 1987.
8. Корнева Е. А., Шкиняз Э. К. Успехи физиол. наук, т. 20, № 3, с. 3-20, 1989.
9. Вальдман А. В., Бабаян Э. А., Звартау Э. Э. Психофармакологические и медико-правовые аспекты токсикоманий. М., Медицина, 1988.
10. The Neuro-immune-endocrine connection (eds. Cotman C. W., Brinton R. E.), N. Y., Raven Press, 1987.
11. Pomonoy N. P., Kastin A. J., Coy D. H. *Life Sci.*, v. 19, № 7, p. 1231-1288, 1976.
12. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В., Мевх А. Т. Биоорганическая химия. Итоги науки и техники, М., ВИНТИ, № 3, с. 1-159, 1985.
13. Плещинский К. Д., Давыдова Т. В. Иммунология. Итоги науки и техники, М., ВИНТИ, 1989.
14. Dafny N., Wazle V. G., Drafh D. B. *Life Sci.*, v. 36, p. 1721-1726, 1985.
15. Montgomery S. P., Dafny D. *Int. J. Immunopharmac.*, v. 9, № 4, p. 453-457, 1987.
16. Aronowsky J., Wicklik M., Gumulha S. W. *Life Sci.*, v. 37, p. 1649-1653, 1985.
17. Dougherty P. M., Drath D. B., Dafny N. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 111, № 17, p. 253-260, 1987.
18. Dougherty P. M. *J. Neuroimmunol.*, v. 13, № 3, p. 331-342, 1987.
19. Dafny N. *Life Sci.*, v. 32, № 4, p. 303-305, 1983.
20. Berkowitz B., Spector S. *Science*, v. 178, № 4067, p. 1250-1292, 1972.
21. Ahmed M. S., Llanos Q. J., Dinarello S. A., Battsis C. M. *Peptides*, v. 6, № 6, p. 1149-1154, 1985.
22. Fontana A., Hengartner H., de Tribolet N., Weber E. *J. Immunol.*, v. 132, № 4, p. 1837-1844, 1984.
23. Dougherty P. M., Harper C., Dafny N. *Life Sci.*, v. 39, № 24, p. 2191-2197, 1986.
24. Lorker A., Abood L. G., Hoss W. *Biochem. Pharmacol.*, v. 29, p. 1361-1365, 1980.
25. Wang J. K. T., Morgan J. L., Spector S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 81, № 3, p. 753-755, 1984.
26. Ameisen J.-C., Meade R., Askenase P. W. *J. Immunol.*, v. 141, № 9, p. 3171-3179, 1989.
27. Hughes P. J., Benyon R., Church M. K. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 242, № 3, p. 1064-1070, 1987.

22. Stefano G. B., Ziao X., Batley D. J. *Neuroimmunol.*, v. 21, № 1, p. 67-74, 1989.
29. P'aul M. *Ann. Rev. Immunol.*, v. 5, p. 621-669, 1987.
30. Maslinski W., Kullberg M., Nordstrom O., Bartfai T. *J. Neuroimmunol.*, v. 17, № 4, p. 256-274, 1988.
31. Ottaway C. A., Greenberg G. R. *J. Immunol.*, v. 132, № 1, p. 417-423, 1984.
32. Dailey M. O., Schreus J., Schulman H. J. *Immunol.*, v. 140, № 9, p. 2931-2936, 1988.
33. Gilman S. C., Schwartz J. M., Milner R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 79, № 13, p. 4226-4230, 1982.
34. Sergeeva M. G., Leshchenko Z. V., Varfolomeev S. D. Abstracts of the 1st International Congress of the International Society for Neuromodulation, Italy, p. 203, 1990.
35. Glennon R. A. *J. Med. Chem.*, v. 30, № 1, p. 1-12, 1987.
36. Miya M., Mocchetti I., Ferrarese C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 84, № 5, p. 1444-1447, 1987.
37. Conlay L. A., Evoniuk G., Wurtman R. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 85, p. 4483-4485, 1988.
38. Coffey R. G., Hadden J. W. *Fed. Proc.*, v. 44, (1 Pt. 1) p. 112-117, 1985.
39. Farrar W. L. Enkephalins-endorphins: stress and immune system. (ed. Plotnikof, N. P.). N. Y., Plenum Press, p. 241-258, 1986.
40. Zavala F., Lenfant M. *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 10, № 5, p. 531-536, 1988.
41. Giarden J. W. *Immunol.*, today, v. 9, № 7/8, p. 235-239, 1988.
42. Shirakawa F., Yamashita U., Chedid M., Mizel C. B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 85, № 21, p. 8201-8205, 1988.
43. Hoffman M. K. *J. Immunol.*, v. 140, № 2, p. 550-552, 1988.
44. Hoffman M. K. *J. Mol. Cell. Immunol.*, v. 3, p. 29-34, 1987.
45. Korbut R., Trabka-Janki E., Grydliewsky R. *J. Eur. J. Pharmacol.*, v. 165, № 1, p. 171-172, 1989.
46. McDorough H. J., Madden J. J., Falek A. J. *Immunol.*, v. 125, № 6, p. 2539-2544, 1980.
47. Yahya M. D., Watson R. R. *Life Sci.*, v. 4, № 23, p. 2503-2510, 1987.
48. Bocchini G., Bonnato G., Canevari A. *Drug Alcohol. Depend.*, v. 11, № 2, p. 233-237, 1983.
49. Bryant H. U., Bernton E. W., Holaday J. W. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 245, № 3, p. 913-923, 1988.
50. Pross S., Klein T., Newton C., Friedman H. *Immunopharmacol.*, v. 14, № 3, p. 159-164, 1987.
51. Klein T. W., Newton C. A., Widen R., Friedman H. *J. Immunopharmacol.*, v. 7, № 4, p. 451-466, 1985.
52. White S. C., Brin S. C., Janicki B. W. *Science*, v. 188, № 4183, p. 71-72, 1985.
53. Pross S., Klein T., Newton C., Friedman H. *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 9, № 3, p. 363-370, 1987.
54. Taupin V., Jayais P., Descamps-Latscha B., Cazalot J.-B., Barrier G., Bach J.-F., Za'ala F. *J. Neuroimmunol.*, v. 35, № 1-3, p. 13-19, 1991.
55. Specter S., Rivenbark M., Newton C. *Int. J. Immunopharmacol.*, v. 11, № 1, p. 63-69, 1989.
56. Lopez-Cepero M., Friedman M., Klein T., Friedman H. *J. Leucocyte Biol.*, v. 39, № 6, p. 679-686, 1986.
57. Baczynsky W. O. T., Zimmerman A. M. *Pharmacol.*, v. 26, № 1, p. 12-19, 1983.
58. Shavit Y., Terman G. W., Lewis J. W. *Brain Res.*, v. 372, № 2, p. 382-385, 1986.
59. Peterson P. K., Sharp B., Gerker G. *J. Immunol.*, v. 133, № 11, p. 3907-3912, 1987.
60. Marcoll M., Ricciuti G., Mazzone A. *Int. J. Immunol.*, v. 10, № 4, p. 425-434, 1988.
61. Hung C. Y., Lefkowitz S. S., Geben W. F. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 142, p. 106-111, 1973.

62. Welch W. D. Res. Commun. Subst. Abuse, v. 4, p. 1-24, 1983.
63. Vai Dyke C., Stessin A., Jones R. J. Clin. Invest., v. 77, № 4, p. 1337-1339.
64. Or D. W., Shen M. L., Lu Y. D. Clin. Immunol. Immunopathol., v. 52, № 2, p. 305-312, 1989.
65. Bagasra O., Formai L. Clin. Immunol., v. 77, p. 289-293, 1989.
66. Hayes H. F., Delaria M., Schiffman G. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., v. 63, № 4, p. 377-383, 1987.
67. Michelson J. B., Friedman S. D., Boyden D. G. Ann. Ophthalmol., v. 14, № 11, p. 1011-1054, 1973.
68. Зозуля А. А., Воронкова Т. П., Пацакова Э., Иванушкин А. М. Фармакология и токсикология, т. 50, № 3, с. 58-59, 1987.
69. Kawakami Y., Klein T. W., Newson C. Int. J. Immunopharmacol., v. 10, № 4, p. 485-488, 1988.
70. Martin B. Pharmacol. Rev., v. 38, p. 45-74, 1986.
71. Fairbairn J. W., Pickens J. T. Br. J. Pharmacol., v. 67, p. 374-385, 1979.
72. Bursztein S. H., Hull K., Hunter S. A., Saito J. Mol. Pharmacol., v. 35, № 1, p. 6-9, 1989.
73. Walton B. Anaesthesia, v. 33, № 4, p. 322-348, 1978.
74. Spurs E. M., Potts R. C., Simpson J. R. Int. J. Immunopharmacol., v. 9, № 4, p. 505-512, 1987.
75. Tubaro E., Anco U., Santigalli G. Int. J. Immunopharmacol., v. 7, p. 865-874, 1985.
76. Prieto J., Subira M. L., Castilla A. Scand. J. Immunol., v. 29, p. 391-398, 1989.
77. Johnston R. B. Jr. N. Engl. J. Med., v. 318, № 12, p. 747-752, 1988.
78. Emrich H. M. Pharmacopsychiatry, v. 16, № 3, p. 91-93, 1983.
79. Formai L. J., Estilow S. Life Sci., v. 43, № 4, p. 339-415, 1988.
80. Pettibone D. J., Muller G. P. Endocrinology, v. 103, № 3, p. 798-802, 1981.
81. Cohen M. R., Nurnberger J. J., Pekar D. Life Sci., v. 29, № 12, p. 1243-1247, 1981.
82. Panerai A. E. Prog. Neuroendocrinimmunol., v. 3, № 1, p. 56, 1990.
83. Matheson G. K., Gage D., White G. Neuropharmacol., v. 27, № 8, p. 823-837, 1978.
84. Roy-Byrne P. P., Lewis N., Villares E. Life Sci., v. 43, № 20, p. 1615-1623, 1988.
85. Neural modulation of immunity (eds. Gaillan R., Cochin M., Melnechuk T.), N. Y., Raven Press, 1985.
85. Lee K. T., Brock T. A., Tolman C. FEBS Lett., v. 249, № 2, p. 139-142, 1989.
87. Захарова Л. А., Петров Р. В. Иммунология. Итоги науки и техники, М., ВИНТИ, т. 25, с. 6-47, 1990.
88. Киселев О. И., Камбарова Д. К., Иваненко А. И. Физиология человека, т. 14, № 3, с. 491-509, 1988.
89. Kunkel S. L., Spengler M., May M. A. JBC, v. 263, p. 5380-5384, 1988.
90. Larrick J. W. Immunol. today, v. 10, № 2, p. 61-66, 1989.
91. Dunn A. J. Prog. Neuroendocrinimmunol., v. 3, № 1, p. 26-34, 1990.
92. Borboni P., Di Cola G., Sesti G., De Pirro R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 163, № 1, p. 642-648, 1989.
93. Boyle M., Yamamoto G., Chen M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 85, № 15, p. 5556-5560, 1988.
94. Farrar W. L., Killian P. L., Ruff M. R. J. Immunol., v. 139, № 2, p. 459-453, 1987.
95. Nistico G., de Sarro G. Prog. Neuroendocrinimmunol., v. 3, № 1, p. 43-43, 1990.
96. Farrar W. L. Prog. Neuroendocrinimmunol., v. 1, № 3, p. 18-22, 1988.
97. Breder C. D., Dinarallo C. A., Saper C. B. Science, v. 240, p. 321-324, 1988.
98. Bateman A., Singh A., Krahl T., Solomon S. Endocrinol. Rev., v. 10, p. 92-112, 1989.

Поступила 15. XII, 1991

УДК 57.053:576.535

СИСТЕМЫ ВТОРИЧНЫХ МЕССЕНДЖЕРОВ В РЕГУЛЯЦИИ
НЕЙРОНАЛЬНОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ
И НЕЙРОСЕКРЕЦИИ

КОНДРАТЬЕВ А. Д., °СЕВЕРИН С. Е., °МОСКВИТИНА Е. Л.,
ПОСЫПАНОВА Г. А., ГУБИН А. И., ЮСУПОВА Р. А., ТУСУПОВ О. К.,
ШМЫРЕВ И. И., ЗОТОВА Е. Е.

Научный центр молекулярной диагностики,

*Институт диабета, Москва.

В работе рассматриваются системы вторичных мессенджеров, опосредующих нейрональную дифференцировку, индуцированную фактором роста нервов, а также регуляторные механизмы, участвующие в процессе секреции нейромедиаторов. С помощью селективных ингибиторов протенинкиназ исследована возможная роль этих ферментов в индукции роста нейритов. Показано, что потенциация этого процесса может быть связана с активацией аденозиновых рецепторов. С помощью окрашивания актина ТРИТЦ-фаллоидином была подтверждена функциональность процесса нейритогенеза, индуцированного прямым модулированием активности различных систем вторичных мессенджеров.

Развитие и нормальное функционирование НС во многом определяется полипептидными факторами роста. К числу факторов, влияющих на нервные клетки, относятся фактор роста нервов (ФРН) [1], фактор роста фибробластов (ФРГ) [2], эпидермальный фактор роста (ЭФР) [3] и ряд других белков. При изучении нейрональной дифференцировки в культуре клеток одним из основных критериев оценки этого процесса является рост нервных отростков. Биохимический механизм, регулирующий этот процесс, в настоящее время не ясен. Удобной моделью для исследований дифференцировки нервных клеток является линия феохромоцитомы РС12 [4], отвечающая на действие ФРН и ФРФ ростом нейритов и приобретающая целый ряд свойств симпатического нейрона.

В последнее время получен ряд данных, указывающих на участие в регуляции дифференцировки нервных клеток целого комплекса протенинкиназ (ЕС 2.7.1.37). В частности, ФРН вызывает изменения в активностях протенинкиназы С [5, 6], сАМР-зависимой [6] и Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протенинкиназы [7]. Ингибитор протенинкиназы К-252а блокировал ФРН-зависимый рост нейритов у клеток РС12 [8, 9] и у симпатических ганглиев [10]. Таким же действием обладал ингибитор протенинкиназы С (ПКС)—сфингозин

[11], а активатор этого фермента—12-о-тетрадекацилфорбол 13-ацетат (ТРА) оказывал противоположное действие [12]. В то же время, клетки РС12, дефицитные по ПКС за счет отрицательной регуляции, сохраняли способность к образованию нейритов под действием ФРН [13]. Ингибитор ПКС и сАМР-зависимой протенинкиназы Н7 [14] стимулировал нейротрофное действие ФРФ и ЭФР в первичных культурах нервных клеток мозга крысы [3].

Имеющиеся в литературе данные не позволяют идентифицировать тип протенинкиназы, ответственной за индукцию роста нейритов. Поскольку действие Н7 на клетки феохромоцитомы РС12 исследовано не было, мы изучили его влияние на их морфологию и способность модулировать индукцию роста нейритов фактором роста нервов.

Для определения влияния Н7 на морфологическую дифференцировку клеток феохромоцитомы РС12 это вещество вводили в культуральную среду в концентрации 50 мкМ либо без ФРН, либо одновременно с ФРН (1,9 нМ). После инкубации в течение 24 ч клетки фиксировали и определяли индекс клеток с нейритами (Ni), выраженный в процентах от общего числа клеток. Было обнаружено, что Н7 сам по себе не вызывал сколько-нибудь заметных изменений величины Ni. Следует, однако, отметить, что Н7 индуцировал вырост нейритоподобных отростков в течение 1 ч после начала инкубации, которые пропадали к 24 ч. Инкубация клеток РС12 с Н7, введенным в культуральную среду вместе с ФРН, приводила к резкому усилению нейритизации клеток. Величина Ni достигала в этом случае $78 \pm 2\%$, в то время как инкубация только с ФРН давала Ni, равный $53 \pm 3\%$.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ингибитор протенинкиназы С способен потенцировать нейритстимулирующий эффект ФРН. В работе Reinhold, Neel [13] было показано, что клетки, объединенные протенинкиназой С после длительной инкубации с фоболовым эфиром, продолжали отвечать на ФРН индукцией роста нейритов. Это свидетельствует о том, что либо мишенью действия Н7 в клетках РС12 служит какая-либо иная протенинкиназа, опосредующая ФРН-зависимую индукцию роста нейритов, либо Н7 нарушает общий протенинкиназный баланс этих клеток. Возможно, что обе эти причины действуют одновременно. Известно, что Н7 способен ингибировать также и протенинкиназу А. Нам удалось получить данные о том, что вещества, влияющие на аденилатциклазную систему, могут вызывать эффекты, похожие на действие Н7.

В частности, нами было исследовано влияние производных аденозина (АТР, АДР, АМР и аденозина) на морфологию клеток РС12 и способность ФРН индуцировать их дифференцировку. При добавлении аденозина и его производных к клеткам РС12 у большей части клеток через короткий промежуток времени (около 1 ч) наблюдался рост нейритов. Число клеток с нейритами уменьшалось к

концу первых суток инкубации с АТР, АДФ, АМР и аденозином аналогично тому, как это происходило в случае Н7.

Инкубация клеток с GTP или Vt_2 cGMP не вызывала нейритизации. Было замечено, что нейритизация, вызываемая АТР, в большой степени зависит от концентрации ионов Mg. Нами было высказано предположение о том, что действующим началом при добавлении в среду производных аденозина является сам аденозин, который, очевидно, появляется в среде под действием ферментов сыворотки и, возможно, эктонуклеотидаз плазматической мембраны самих клеток. Для проверки этого предположения мы добавляли в культуральную среду, наряду с аденозином или АТР, дипиридамо, являющийся ингибитором транспорта аденозина в клетку [15]. Дипиридамо в концентрации 10 мкМ значительно пролонгировал нейритизацию, вызванную этими реагентами. Поскольку на клетках РС12 были показаны рецепторы аденозина типа А2, можно предположить, что наблюдаемые эффекты связаны с аденилатциклазной системой.

Для оценки функциональности индукции нейритоподобных отростков в течение 1 ч инкубации с указанными модуляторами с системой вторичных мессенджеров был использован метод окрашивания клеток РС12 ТРИТЦ-фаллоидином. Увеличение окрашивания клеток этим реагентом свидетельствует о перераспределении активного цитоскелета и характерно для действия ФРН [16]. Нами показано, что ранняя нейритизация, вызванная производными аденозина, сопровождается аналогичной реорганизацией актина. Похожие результаты были получены и в случае обработки клеток Н7 и ФРН+Н7.

Участие ПКС в выполнении важнейших специализированных функций нейронов было неоднократно показано на клетках РС12. Ранее была продемонстрирована связь ПКС с регуляцией секреции нейромедиаторов. С этим же процессом связана, вероятно, ее способность фосфорилировать тирозингидроксилазу—ключевой фермент синтеза ряда нейротрансмиттеров [17]. Транслокация ПКС из цитозоля на клеточную мембрану, сопровождающая активацию данного фермента, была показана на клетках РС12 под действием агонистов мускариновых ацетилхолиновых рецепторов [18] и эфиров форбола [13]. Способность ФРН индуцировать транслокацию ПКС в клетках РС12 ранее не исследовалась и стала одной из целей данной работы. Нами была изучена активность ПКС в цитоплазматической и мембранной фракциях клеток РС12 после их инкубации с ФРН.

Для определения активности ПКС к клеткам РС12 добавляли эффекторы и инкубировали 15 или 60 мин. По окончании инкубации клетки снимали с субстрата, гомогенизировали, разделяли цитоплазматическую и мембранную фракции и определяли протеникиназную активность. На рис. 1, а приведены результаты измерения активности ПКС в цитозольной фракции клеток РС12 после 15 мин инкубации с ФРН и ТРА в концентрации 1,9 нМ и 0,1 мкМ соответственно. Из данных, представленных на рис. 1, а, видно, что под

действием и ФРН, и ТРА наблюдалось некоторое повышение активности ПКС. ФРН вызывал активацию фермента на $118 \pm 4\%$ по сравнению с контрольными клетками, а ТРА—на $131 \pm 8\%$.

В связи с тем, что мы показали резкое усиление нейрестимулирующей активности ФРН в присутствии Н7, было исследовано влияние этого вещества на ФРН-индуцированные изменения активности ПКС. Оказалось, что совместная инкубация клеток РС12 с Н7 и ФРН приводила к исчезновению активирующего эффекта ФРН в цитозоле (рис. 1, а). Существенных отличий в характере и ин-

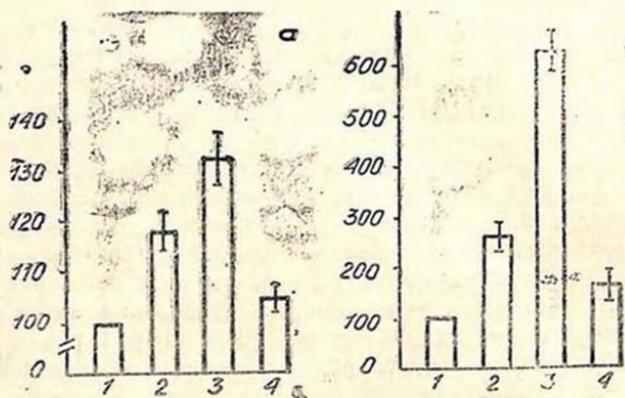


Рис. 1. а—влияние ТРА (2), ФРН (3) и ФРН + Н7 (4) на активность протенинказы С в цитозольной фракции клеток РС12. Активность ПКС в контроле (1) составила 14500 ± 270 имп/мин на мг белка. По оси ординат—активность ПКС (%); б—влияние ТРА (2), ФРН (3) и ФРН + Н7 (4) на активность протенинказы С в мембранной фракции клеток РС12. Активность ПКС в контроле (1) составила 9789 ± 120 имп/мин на мг белка. По оси ординат—активность ПКС (%).

тенсивности эффектов ТРА, ФРН и Н7 + ФРН между 15 и 60 мин инкубации не наблюдалось. Следует отметить, что в цитозоле ПКС находится в неактивном состоянии из-за отсутствия кофакторов. Таким образом, наблюдаемое в случае ТРА и ФРН повышение активности не является следствием активации *in vivo*, а происходит за счет добавления экзогенных кофакторов *in vitro*, в процессе постановки ферментативной реакции. Возрастание активности в данном случае может быть объяснено увеличением количества фермента в цитозольной фракции, происходящим под действием примененных нами эффекторов.

На рис. 1, б приведены данные измерения активности ПКС в мембранной фракции клеток РС12, обработанных теми же эффекторами. Показано, что под действием ФРН и ТРА наблюдалось резкое повышение активности ПКС (в 2,6 и 6,2 раза соответственно). Н7, который стимулировал ФРН-индуцированный рост нейритов, практически полностью блокировал вызванную ФРН активацию

ПКС в мембранах (рис. 1, б). Как и в цитоплазме, различий между 15 мин и 1 ч инкубации клеток с эффекторами не наблюдалось.

Полученные данные об активности ПКС в мембранной фракции клеток РС12 свидетельствуют о том, что ФРН вызывает транслокацию ПКС из цитоплазмы в мембрану, что является характерным признаком активации данного фермента, происходящей *in vivo*. Вместе с тем, нами было обнаружено некоторое повышение активности ПКС в цитоплазме после обработки клеток ФРН, что совпадает с результатами Напа и соавт. [5]. В сочетании с данными об активности фермента в мембранной фракции это указывает на возможную быструю стимуляцию биосинтеза ПКС под действием ФРН. Аналогичный эффект наблюдался и в присутствии ТРА, что может быть свидетельством регуляции этого процесса самой ПКС по механизму обратной связи. Обращает на себя внимание практически полная блокада ФРН-индуцированного повышения активности ПКС ее ингибитором Н7, который обладает мощной нейрестимулирующей активностью именно в сочетании с ФРН как в мембране, так и в цитозоле. Одно из этих явлений—блокада активации в мембране или накопления ПКС в цитозоле, возможно, и ответственно за нейрестимулирующее действие Н7. Не исключено, что обе причины действуют одновременно.

Известно, что ПКС в ассоциации с фосфолипидами и ионами кальция является рецептором форболовых эфиров [19]. Поэтому форбол 12, 13-дibuтират ($[^3\text{H}]\text{PDBu}$) часто используется для оценки концентрации ПКС в различных тканях, а также для определения ее внутриклеточной локализации. Данные, полученные с помощью определения активности, показали, что в клетках РС12 наблюдается транслокация ПКС под действием форболовых эфиров и ФРН. Для подтверждения этого эффекта мы использовали метод связывания $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ с клетками РС12. Кроме того, определение ферментативной активности не отвечает на вопрос, чем вызван эффект Н7—ингибированием активности ПКС или блокадой транслокации?

Клетки РС12 обрабатывали ФРН, Н7 и ФРН + Н7 в течение 5 и 15 мин. Нами показано, что при инкубации контрольных клеток РС12 с $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ специфическое связывание составляло $2,25 \pm 0,5$ пмоль/мг белка после инкубации клеток в течение 15 мин с ФРН. Добавление в инкубационную среду Н7 в концентрации 50 мкМ, индуцирующей вместе с ФРН максимальный рост нейронов, полностью снимало стимулирующий эффект ФРН.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности фактора роста нервов увеличивать связывание форболового эфира с протеникиназой С, что принято считать доказательством ее транслокации на мембрану. Эти данные подтверждают результаты определения активности этого фермента в мембранной и цитоплазматической фракциях клеток феохромоцитомы РС12. Блокада связывания $[^3\text{H}]\text{PDBu}$ Н7 указывает на способность этого соединения

ингибировать именно процесс транслокации протеникиназы С, а не только активность данного фермента.

Одним из наиболее наглядных методов детектирования транслокации ПКС в мембрану является электроблоттинг. Клетки РС12 инкубировали с ТРА (0,1 мкМ), ФРН (1,9 нМ) и ФРН+Н7 (50 мкМ), разрушали и разделяли мембранную и цитозольную фракции. После электрофоретического разделения белков цитозольной и мембранной фракции клеток осуществляли их электроперенос на нитроцеллюлозу и последующее окрашивание моноклональными антителами к ПКС. Применение данного метода дает возможность не только визуализировать транслокацию, но и исключить интерпретацию результатов метода связывания форболового эфира, указывающую на возможность повышения сродства [³H]PDBu к ПКС под действием ФРН.

Процесс транслокации ПКС, индуцированный ТРА хорошо изучен, в том числе и с помощью метода иммуноблоттинга. Нами было проведено исследование временной зависимости этого процесса на клетках РС12 и сравнение его с эффектом ФРН. Показано, что в контрольных клетках РС12 ПКС детектировалась и в цитозольной, и в мембранной фракциях. Под действием ТРА происходило увеличение количества ПКС в мембранной фракции клеток РС12 уже через 5 мин (в 1,7 раза). Через 15 мин увеличение достигало максимального значения (в 3,4 раза по сравнению с контролем) и существенно не изменялось в течение последующих 45 мин. Повышение содержания протеникиназы С в мембранной фракции сопровождалось соответствующим ее уменьшением в цитозоле. Эффект ФРН был аналогичен действию ТРА как в мембранах, так и в цитозоле. Н7 при совместной инкубации с ФРН полностью блокировал влияние фактора.

Подтвердив наличие транслокации ПКС в клетках РС12 под действием ФРН, метод иммуноблоттинга не позволил обнаружить увеличение количества ПКС в цитозоле под действием как ТРА, так и ФРН, на что указывало измерение активности. Вероятно, такое различие связано с тем, что ПКС существует в виде трех изоформ— α , β и γ . Антитела, которые мы применяли для иммуноблоттинга, направлены против изоформ α и β . Возрастание активности в цитозоле может быть связано с увеличением количества γ изоформы, которая не детектируется используемыми антителами.

В работе Ehrlich и соавт. [20] было показано, что на поверхности нервных клеток детектируется протеникиназная активность. Предполагаемыми субстратами этой протеникиназы служат белки клеточной адгезии. Поскольку индукция роста нейритов предполагает значительные изменения на поверхности клеток РС12, нами ранее был предпринят поиск поверхностной протеникиназы (эктопротеникиназы) и показано ее наличие в этих клетках [21]. Мы решили исследовать не происходит ли при транслокации ПКС ее

экспонирования во внеклеточное пространство. Для решения этой задачи мы использовали проточную цитофлуориметрию.

Проточный цитофлуориметр дает возможность детектировать наличие антигена на внешней поверхности мембраны. Моноклональные антитела к ПКС, конъюгированные с ФИТЦ, добавляли

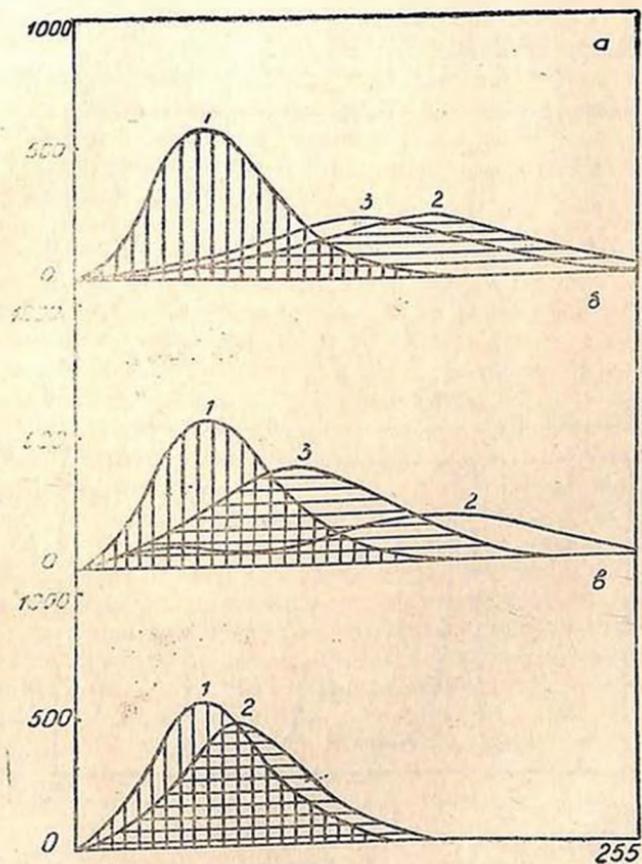


Рис. 2. Интенсивность флуоресценции клеток РС12, меченных моноклональными антителами к протеникиназе С, без обработки эффекторами (1) и после обработки: а—ТРА в течение 15 мин (2) и 60 мин (3); б—ФРН (2) и ФРН + Н7 (3) в течение 15 мин; в—Н7 в течение 15 мин (2). По оси абсцисс—интенсивность флуоресценции (отнесенные единицы). По оси ординат—число клеток.

клеткам РС12, обработанным эффекторами. После инкубации и соответствующих промывок клетки анализировали на проточном цитофлуориметре EPICS C. После 15 мин инкубации клеток с ТРА концентрации 0,1 мкМ наблюдалось увеличение связывания с ними ФИТЦ-меченых моноклональных антител. Результаты этого экспери-

мента представлены на рис. 2, а. Из данных, приведенных на рисунке, видно, что обработка ТРА увеличивала флуоресценцию клеток с 41 относительной единицы до 165. Через 60 мин эффект несколько уменьшался (до 145 относительных единиц). Аналогичное увеличение происходило и в случае обработки клеток ФРН в концентрации 1,9 нМ (рис. 2, б). Н7 в концентрации 50 мкМ сам по себе не оказывал никакого влияния (рис. 2, в), а в комбинации с ФРН полностью блокировал его действие (рис. 2, в). В ходе дан-

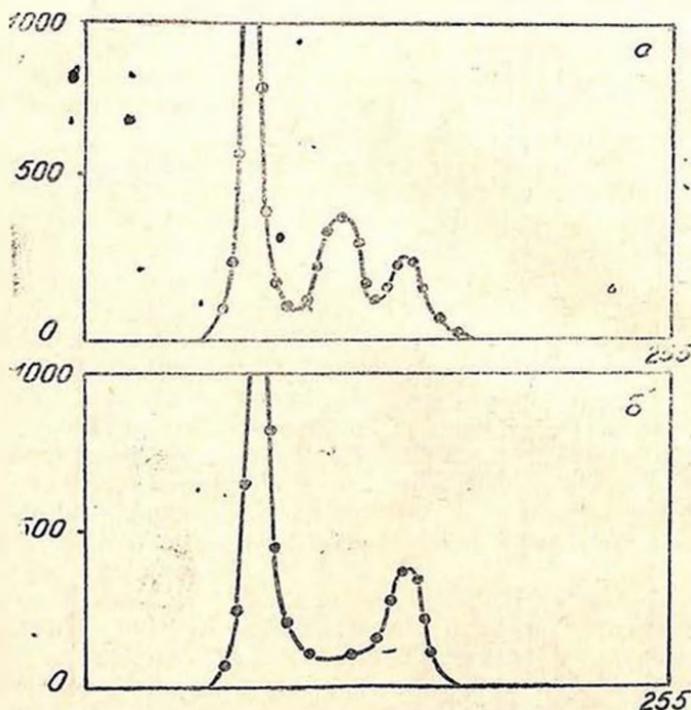


Рис. 3. Распределение клеток PC12 по стадиям клеточного цикла при плотности посева 0,5 млн (а) и 1,5 млн (б) клеток на чашку. Петри диаметром 6 см. Окрашивание бромистым этидием. По оси абсцисс—содержание ДНК (интенсивность флуоресценции в относительных единицах). По оси ординат—число клеток.

ного эксперимента, однако, наблюдалось разрушение большого числа клеток (до 80%), что связано, вероятно, с условиями инкубации (в присутствии азиды натрия) и механическим снятием клеток с субстрата.

Таким образом, транслокация ПКС была подтверждена и с помощью проточной цитофлуориметрии. Полученные результаты, однако, не свидетельствуют об экспонировании ПКС во внесклеточное пространство. Следует отметить, что увеличение флуоресценции кле-

ток после обработки их ТРА и ФРН может быть объяснено не только транслокацией фермента и/или выходом антигена на внешнюю сторону мембраны, но и повышением, после воздействия данных эф- фекторов, сродства ФИТЦ-меченых антител к ПКС, проникших в разрушенную клетку. Однако, принимая во внимание данные имму- ноблоттинга, показавшие количественные изменения содержания ПКС в цитозоле и мембранах, а также результаты связывания [^3H]РДВи и определения ферментативной активности, можно предположить, что эффект, наблюдаемый на EPICS C, вызван увеличением кол- чества ПКС в мембранах клеток РС12 после обработки ТРА и ФРН. Цитоплазматическая ПКС, скорее всего, вымывается при про- мывках клеток в ходе эксперимента.

При проведении данных экспериментов была обнаружена зави- симость эффекта транслокации С от плотности посева клеток РС12. Эффект лучше всего детектировался при плотности посева 0,5 млн клеток на чашку Петри диаметром 6 см. При увеличении плотности в 3 раза эффект полностью исчезал.

Ранее было показано, что ФРН действует на клетки РС12 в стадии клеточного цикла С1. Клетки, находящиеся в других стадиях цикла, проходят их и выходят из цикла в С1 [2]. Нами было ис- следовано распределение клеток РС12 по стадиям клеточного цикла в зависимости от плотности посева и связь этого распределения с наличием эффекта ФРН на транслокацию ПКС. Для этого клетки высаживали с плотностями 0,5 и 1,5 млн на чашки Петри диаме- тром 6 см. Через 12—14 ч после высадки клетки обрабатывали бро- мистым этидием и анализировали на проточном цитофлуориметре. На рис. 3 приведены гистограммы, отражающие распределение кле- ток по стадиям цикла в зависимости от плотности посева. Из дан- ных, приведенных на этих рисунках, видно, что клетки РС12, вы- сажённые с низкой плотностью (рис. 3, а), отличаются от клеток с высокой плотностью (рис. 3, б) наличием характерной популяции, на- ходящейся в S-фазе. Эта популяция составляет $21 \pm 0,5\%$ от всех клеток, что существенно превышает значения, присущие клеткам, высаженным с высокой плотностью ($13 \pm 2\%$). Через 6—8 ч пик в S-фазе переставал детектироваться. Одновременно с этим пропадало влияние ФРН на локализацию ПКС. Появление пика в S-фазе связано, вероятно, с частичной синхронизацией клеток, происходя- щей при пересеве и окончанием лаг-периода через 12—14 ч, то есть к моменту, когда определение распределения клеток по циклу ста- новится возможным методически. У клеток с высокой плотностью посева лаг-период длится, вероятно, меньше, и синхронное появле- ние популяции в S-фазе не детектируется используемым методом, поскольку появляется ранее 12 ч. Выдерживание клеток перед по- становкой эксперимента в течение не менее 12 ч после высадки не- обходимо для их нормального прикрепления к субстрату.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ФРН оказывает влияние на транслокацию ПКС из цитозоля в

мембрану только в популяции феохромоцитомы PC12, обогащенной клетками в S-фазе. Эти результаты могут указывать на то, что ПКС, регулируемая ФРН, имеет отношение к клеткам PC12, интенсивно синтезирующим ДНК. Снижение пролиферативной активности под действием ФРН сопровождается индукцией роста нейритов. Действие И7, потенцирующее рост нейритов и полностью блокирующее при этом действие ФРН на ПКС, подтверждает участие этого фермента в регуляции пролиферации клеток PC12.

На основании полученных данных можно сделать вывод о способности ФРН оказывать влияние на ПКС и об участии этого фермента в регуляции пролиферативной активности клеток PC12. Кроме того, следует констатировать, что влияние ФРН на ПКС связано, по всей видимости, с S-фазой клеточного цикла. Стимуляция ФРН-индуцированного роста нейритов И7 связана, вероятно, с теми же причинами, которые вызывают этот эффект при блоке пролиферации γ -интерфероном, как это описано в работе Improtа и соавт. [22].

Важную роль играет ПКС и в регуляции секреции нейромедаторов. Одним из ключевых белковых субстратов, участвующих в регуляции нейросекреции через белковое фосфорилирование, является синапсин I—нейроспецифический белок, впервые описанный Ueda, Greengard [23], локализованный в синаптических окончаниях нервных клеток. Установлено, что С1 ассоциирован с цитоплазматической поверхностью синаптических везикул и, по-видимому, выступает в качестве якоря для везикул, так как способен также связываться с белками цитоскелета [24].

В предыдущих работах [25, 26] мы показали, что нейроспецифический белок синапсин I, эффективно и специфически фосфорилируется не только сАМР-зависимой протенинкиназой (ПКА) и Ca^{2+} -кальмодулинзависимой протенинкиназой II (ПК II), о чем было известно из литературы [27], но и ПКС. Детальный молекулярный механизм кальмодулинзависимого фосфорилирования С1 был описан ранее в ряде статей [28—30]. В частности, было показано, что данная модификация приводит либо к ослаблению взаимодействия молекулы синапсина I с синаптической везикулой [29], либо к аутопротеолизу белковой молекулы [28], после чего освобожденная везикула сливается с пресинаптической мембраной и происходит нейросекреция. В то же время, факт ПКС-зависимого фосфорилирования С1 ранее упоминался в работе De Camilli, Greengard [31], однако физиологическая значимость данного процесса отрицалась.

В данном исследовании мы использовали гомогенный синапсин I из мозга человека. Исследование кинетики его фосфорилирования ПКС, а также сравнение данного процесса с ПК II-зависимым фосфорилированием показало, что максимальные скорости этих двух процессов практически не отличаются, а величина K_m для синапсина, фосфорилируемого ПКС, составляет 0,25 мкМ (в расчете на M_r С1, равную 80000 Д), что было сопоставимо и даже несколько ниже соответствующих величин K_m для других протенин-

наз, фосфорилирующих данный нейроспецифический белок [32, 33]. Это дало нам возможность предположить, что С1 является физиологическим субстратом также и для ПКС.

Ранее мы показали, что ПК С обладает более высоким сродством к фосфатидилнозиту, по сравнению с фосфатидилсерином при фосфорилировании гистона Н1 [34]. Поэтому представляется интересным исследование функциональной роли фосфоинозитидов, как модуляторов активности данного фермента.

Установив, как отмечалось выше, что чистые фосфолипиды являются эффективными активаторами ПКС-опосредованного фосфорилирования С1 [26], мы исследовали влияние одного из наиболее функционально активных соединений, участвующих в обмене фосфоинозитидов—фосфатидилнозит-4,5-дифосфата (ФИФ₂), а также диацилглицерина на степень активации данного процесса ФС и ФИ. При этом учитывалось реальное соотношение полифосфоинозитидов и диацилглицерина в мембранах нервных клеток [35].

Таблица

Активация ПКС-зависимого фосфорилирования синапсина I кислыми фосфолипидами

Константа активации мкг/мл	Липид	Липид + Ф.1Ф	Липид + ДСГ
K _a (ФИ)	1,1	0,2	0,6
K _a (ФС)	0,8	0,6	0,4

Как видно из таблицы, при добавлении в инкубационную среду диацилглицерина происходило увеличение сродства фермента к фосфолипидам (ФИ и ФС) приблизительно в два раза. В то же время при добавлении в инкубационную среду ФИФ₂ (при концентрации 0,5 мкг/мл) в присутствии ФИ величина кажущейся константы активации (K_a) для ФИ уменьшается в пять раз: от 1,1 до 0,2 мкг/мл, а в случае ФС этот эффект не выражен.

Хорошо известно, что активации ПКС мембранными липидами предшествует увеличение концентрации внутриклеточного кальция и последующая транслокация фермента на мембрану [36]. Поскольку содержание ФС в мембранах нервных клеток в 2—3 раза выше, чем содержание ФИ [35], а также имеет место большее сродство ПКС к ФИ в присутствии как ФИФ₂, так и ДОГ, следует предположить, что ФИФ₂, наряду с диацилглицерином, может являться физиологическим активатором ПКС-зависимого фосфорилирования С1 в нервных клетках. Однако, если диацилглицерид будет модулировать активность ПКС при рецепторзависимом распаде фосфоинозитидов, ФИФ₂, в свою очередь, будет способен активировать ПКС в отсутствие гормонального сигнала.

Поскольку ранее нами было также показано, что процессы кальмодулин- и фосфолипидзависимого фосфорилирования С1 взаи-

мозависимы, то есть активаторы ПКС (жирные кислоты и кислые фосфолипиды) ингибируют модулируемое ПК II фосфорилирование, а кальмодулин—стимулятор ПК II подавляет зависимое от протеникиназы С фосфорилирование синапса I [26], можно предположить, что регуляция нейросекреции как *in vivo*, так и на уровне клеточных осуществляется путем одновременного запуска обеих систем Ca^{2+} -зависимого фосфорилирования.

SYSTEMS OF SECOND MESSENGERS MEDIATING PROCESSES OF NEURAL DIFFERENTIATION AND NEUROTRANSMITTER RELEASE

KONDRATYEV A. D., *SEVERIN S. E., *MOSKVIINA E. L., POSYPANOVA G. A., GUBIN A. N., YUSUPOVA R. A., TUSUPOV O. K., SHIMYREV I. I., ZOTOVA E. E.

Research Center of Molecular Diagnostics,
*Institute of Diabetes, Moscow.

Possible systems of second messengers, mediating NGF-induced differentiation of nerve cells and regulation of neurotransmitter release are discussed. Using selective protein kinase inhibitors the possible role of these enzymes in the induction of neurite outgrowth has been studied. The process of neurite outgrowth initiation has been shown to be rapidly potentiated by the activation of adenosine receptors. Using selective staining of actin, the process of neurite induction by the direct effect of protein kinase activity modulators has been shown to be as functional as in the case of NGF action.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yankner B. A., Shooter E. M. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 51, p. 845—868, 1982.
2. Rydel R. E., Greene L. A. *J. Neurosci.*, v. 7, p. 3639—2653, 1987.
3. Morrison R. S., Gross J. L., Moskale J. R. *Brain Res.*, v. 473, p. 141—145, 1988.
4. Greene L. A., Tishler A. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 73, p. 2424—2428, 1976.
5. Hama T., Huang K.—P., Guroff G. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, v. 83, p. 2353—2357, 1986.
6. Cremins J., Wagner J. A., Hategoua S. J. *Cell. Biol.*, v. 103, p. 887—893, 1986.
7. Nairn A. C., Nichols R. A., Brady M. J., Palfrey H. C. *J. Biol. Chem.*, v. 262, p. 14265—14272, 1987.
8. Hashimoto S. *J. Cell Biol.*, v. 107, p. 1531—1539, 1988.
9. Koizumi S., Contreras M. L., Matsuda Y., Hama T., Lazarovici P., Guroff G. *J. Neurosci.*, v. 8, p. 715—721, 1988.
10. Matsuda Y., Fukuda J. *Neurosci. Lett.*, v. 87, p. 11—17, 1988.
11. Hall F. L., Fernyhough P., Ishii D. N., Vulliamy P. R. *J. Biol. Chem.*, v. 263, p. 4460—4466, 1988.
12. Burstein D. E., Blumberg P. M., Greene L. A. *Brain Res.*, v. 247, p. 115—119, 1982.
13. Reinhold D. S., Neet K. E. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 3538—3544, 1989.

14. *Hidaka H., Inagaki M., Kawamoto S., Sasaki Y.* Biochemistry, v. 23, p. 5036—5041, 1984.
15. *Richardson P. J., Browne S. J., Baillyes E. M., Luzio J. P.* Nature, v. 327, p. 232—234, 1987.
16. *Paves H., Neuman T., Metsis M., Saarna M.* FEBS Lett., v. 235, p. 141—143, 1988.
17. *Divirgilio F., Pozzan F., Wollheim C. B., Vincentini L. M., Me'dolesi J. J.* Biol. Chem., v. 261, p. 32—35, 1986.
18. *Messing R. O., Stevens A. M. J.* Neurosci., v. 9, p. 507—512, 1989.
19. *Nishizuka Y.* Nature, v. 308, p. 693—698, 1984.
20. *Ehrlich Y. H., Davis T. B., Bock E., Kordecki E., Lenox R. H.* Nature, v. 320, p. 67—69, 1989.
21. *Rudkin B. B., Lazarovici P., Levi B.—Z., Abe Y., Fujita K., Guroff G.* EMBO J., v. 8, p. 3319—3325, 1989.
22. *Improta T., Salvatore A. M., Di Luzio A., Romo G., Cocchia E. M., Callisano P.* Exp. Cell Res., v. 179, p. 1—9, 1988.
23. *Ueda T., Greengard P. J.* Biol. Chem., v. 252, p. 5155—5163, 1977.
24. *Hirokawa N., Sobue K., Kanda K., Harada A., Yorifuji H. J.* Cell Biol., v. 103, p. 111—126, 1989.
25. *Severin S. E. (Jr.), Bykova E. V., Moskvitina E. L., Severin E. S. J.* Protein Chem., v. 8, p. 359—362, 1989.
26. *Severin S. E. (Jr.), Moskvitina E. L., Bykova E. V., Lutzenko S. V., Shvets V. I.* FEBS Lett., v. 259, p. 223—226, 1989.
27. *Nestler E. J., Greengard P.* Prog. Brain Res., v. 69, p. 323—339, 1986.
28. *Severin S. E. (Jr.), Moskvitina E. L., Gubin A. N., Kiselev V. I.* Adv. in Enzyme Regulation v. 29 (in press), 1991.
29. *Llinas R., McGuinness T. L., Leonard C. S., Sugimori M., Greengard P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 82, p. 3035—3039, 1985.
30. *Severin S. E. (Jr.), Moskvitina E. L., Bykova E. U., Lutzenko S. V., Shvets V. I.* Biologicheskije Membrany (Russ.), v. 7, p. 718—723, 1990.
31. *De Camilli P., Greengard P.* Biochem. Pharmacol., v. 35, p. 4349—4357, 1986.
32. *Vattano M. L.* Pharmacol., v. 37, p. 2381—2388, 1988.
33. *Nairn A. C., Greengard P. J.* Biol. Chem., v. 262, p. 7273—7281, 1987.
34. *Severin S. E. (Jr.), Tozmassyan E. K., Shvets V. I.* Biokhimiya (Russ.), v. 51, p. 1135—1139, 1989.
35. *Sastry P. S.* Prog. Lipid Res., v. 24, p. 69—176, 1985.
36. *Kikkawa U., Kitano T., Saito N., Fujiwara H., Nakanishi H., Kishimoto A., Taniyama K., Tanaka C., Nishizuka Y.* Prog. Brain Res., v. 69, p. 29—35, 1986.

Получена 23. II. 1991

ЗАМЕЧЕННЫЕ ОПЕЧАТКИ

стр.	строка	напечатано	должно быть
56	21 снизу	Предполагается, что индуцируемое ПОЛ модифицирование каталитических свойств	Аудиогенный эпилептиформный судорожный припадок у крыс линии <i>Крушин-</i>
123	10 сверху	Огп—оринтин	Огп—орнитин

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

1. В журнале публикуются оригинальные статьи, содержащие результаты экспериментальных исследований по биохимии нервной системы, обзоры по важнейшим вопросам современной нейробиологии, рецензии на новые издания и актуальная научная хроника.

Объем рукописи (включая резюме, список литературы, иллюстрации) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзоров не должен превышать 25 с., кратких сообщений, рецензий и хроники—6 с., а писем в редакцию—3 с.

Рукопись статьи должна подписываться всеми авторами (2 экз.), сопровождаться актом экспертизы (2 экз.) и направлением от учреждения.

2. Ко всем статьям в сообщении прилагается на отдельном листе резюме на английском языке, которое должно быть озаглавлено, в нем указываются авторы и название учреждения, в котором выполнена работа. Резюме на русском языке для экспериментальных статей и обзоров должно быть напечатано на машинке через 1,5 интервала и расположено в начале статьи, непосредственно под заголовком. Резюме для кратких сообщений следует приложить на отдельном листе.

Экспериментальные статьи, являющиеся основным публикуемым материалом в журнале, должны быть построены по следующему плану: резюме на русском языке, краткое введение с указанием цели работы, материалы и методы, результаты и обсуждение, резюме на английском языке, литература. Вверху справа от названия статьи указывается индекс универсальной десятичной классификации (УДК), под фамилиями авторов приводится полное название учреждения, в котором выполнена работа.

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

4. Рисунки, отчетливо выполненные тушью на плотной белой бумаге или кальке, представляются в конверте в двух, а фотографии—в трех экземплярах. На обороте каждого рисунка карандашом следует указать фамилии авторов, сокращенное название статьи и порядковый номер, для фотографий (на глянцевой бумаге) следует указать ее верх и низ. Подписи к рисункам и фотографиям представляются на отдельном листе. Замена фотоиллюстраций электрофоретических исследований рисованными схемами не допускается. Количество иллюстративного материала (таблицы и рисунки) не должно превышать в статьях 6, в кратких сообщениях—1.

5. Формулы и индексы должны быть вписаны четко черными чернилами или пастой, обязательно выделить курсивом (подчеркнуть волнистой линией) и различить прописные и строчные буквы, мало отличающиеся по своему написанию, двумя черточками снизу или сверху, буквы греческого алфавита подчеркиваются красным карандашом.

Фамилии иностранных авторов даются в тексте на языке оригинала.

6. Название ферментов и коферментов, символы кинетики ферментов и единиц активности, написание соединений, меченных изотопами, и т. п. должны соответствовать требованиям Международного биохимического союза. Разрешаются лишь общепринятые современные сокращения слов, различных единиц измерения, физических и химических величин, терминов и т. п. В приложении к правилам для авторов, которое публикуется в каждом первом номере нашего журнала, приводится список наиболее часто употребляемых сокращенных обозначений, применяемых без специальной расшифровки.

Используемые авторами другие сокращенные слова при первом упоминании даются полностью и в скобках в сокращенном виде.

7. Список литературы составляется в порядке цитирования, его объем—до 25 названий для статей, до 80—для обзоров и до 15—для кратких сообщений. В тексте ссылки даются в квадратных скобках. Цитируемая литература в списке приводится в следующем порядке: порядковый номер, фамилия, инициалы авторов на языке оригинала, название журнала, том, номер или выпуск, страницы, год издания. В случае сплошной нумерации страниц тома номер выпуска не указывать. При цитировании книги указывается также, под чьей редакцией она издана, название издательства и место издания. Например:

1. *Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А.* *Вопр. мед. химии*, т. 7, с. 538—544, 1962.

2. *Георгиев Г. П.*—В кн.: *Цитология ферментов* (под ред. А. А. Покровского), с. 32—83, М., Мир, 1971.

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

9. В случае возврата статьи для исправления датой поступления ее в редакцию считается день получения исправленного текста.

10. Редакция высылает авторам бесплатно оттиски опубликованной статьи.

11. При отсылке рукописи в редакцию рекомендуется прилагать к заказному письму или бандероли уведомление о вручении, редакция, в свою очередь, сообщает автору о получении статьи.

12. В случае, если статья будет отклонена редакцией, возвращается второй экземпляр рукописи и акт экспертизы.

13. Корректуру авторам редакция не высылает.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Journal „Neirokimiia“ will primarily publish papers that present the results of original research on biochemistry of nervous system, short communications, reviews of actual problems of neurochemistry, chronicles, reviews of new books and letters to Editor.

The Journal will accept papers from any country. Manuscripts should be typed in English, no longer than 15 pages in toto (typed with double spacing), reviews—20 pages, short communications and chronicles—4 pages, letters to Editor—2 pages. Authors should submit 2 copies of their contribution together with tables and figures. Manuscripts should conform to the „Instructions“ and should be submitted to:

The Editorial Office
Journal „Neirokimiia“
P. Sovak str. 5 1, Yerevan 375044, USSR

Arrangement of the manuscript

1. The first page should bear:

- a) the title, concise but informative
- b) the complete names of the author(s)
- c) the name of the lab where the work was carried out
- d) the address to which correspondence should be sent

2. Each paper should be preceded by a Summary giving a brief account to the most relevant contributions of the paper (100–200 words, 1.5 spacing) It's important to indicate the goal, the methods, the results and conclusions.

3. Experimental papers should be divided into the following sections: Materials and Methods, Results and Discussion, Reference List. It may be often advantageous to have only 2 sections: Results and Discussion. There's no need to split short communication.

4. Bibliographic citations should be made in numerical order (not more than 25 References for articles, 80—for reviews, 15—for short communications), in square brackets and in order of their citation in the text. The form of listed references is as follows: surname and initials of authors, journal name, volume and issue number inclusive page numbers and year. For book titles the style is similar but contains book title—“In“ followed by initials, surname of editor, the name and location of the publishing company.

5. Tables should be typed on separate pages and numbered in the order they appear in the text. They must have heading and contain only usually adopted abbreviations. Figures and graphs should be drawn separately on good quality drawing or tracing paper and put into envelope. Photographs should be glossy and as rich in contrast as possible. The back of each figure and photo should be labelled lightly in soft pencil to show the top of it, the author's name and the figure and photo number. Legends to figures and photos should be typed on separate pages.

6. The Editorial Board has got the right to shorten and improve the text not altering the main meaning.

7. Proofs are not sent to authors. For each article reprints are supplied free of charge.

Стандартные обозначения некоторых тривиальных названий химических соединений

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

*Стандартные обозначения аминокислот и моносахаридов допустимо употреблять в сокращенном виде при написании структур, а также в таблицах и на рисунках.
 **Соответствующие дезоксиррибонуклеотиды обозначаются путем добавления латинской строчной буквы d перед трехбуквенным символом.

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

АХЭ—ацетилхолинэстераза	ЭСР—электронный спиновый резонанс
БСА—бичий сывороточный альбумин	ЯМР—ядерный магнитный резонанс
ВЭЖХ—высокоэффективная жидкостная хроматография	А—абсорбция (поглощение)
ГЖХ—газожидкостная хроматография	г—константа скорости реакции
ГЭБ—гематоэнцефалический барьер	K_a —константа активации
ДЭАЭ-ц—диэтиламиноэтилцеллюлоза	K_d —константа диссоциации
ИКС—инфракрасная спектроскопия	K_i —константа ингибирования
ИОХ—ионообменная хроматография	K_m —константа Михаэлиса
ИЭТ—изоэлектрическая точка	K_s —субстратная константа
ИЭФ—изоэлектрическое фокусирование	n —коэффициент Хилла
КМ-ц—О-карбоксиметилцеллюлоза	V —максимальная скорость реакции
МАО—моноаминоксидаза	Ки—кюри
М.Е.—международная единица	мКи—милликюри
М—молярность	Р—рентген
M_r —молекулярная масса (вес)	имп/мин—импульсы за минуту
м-, о-, п.—мета-, орто-, пара-	Д—дальтон
н.—нормальный (раствор)	кД—килодальтон
НС—нервная система	ч—час
ПААГ—полиакриламидный гель	мин—минута
ПОЛ—перекисное окисление липидов	с—секунда
СМЖ—спинномозговая жидкость	мкм—микрометр
т. кип.—температура кипения	мл—миллилитр
т. пл.—температура плавления	мкл—микролитр
ТСХ—тонкослойная хроматография	мг—миллиграмм
У.А.—удельная активность	мкг—микрограмм
УФ-спектр—ультрафиолетовый спектр	нг—нанограмм
ФДЭ—фосфодиэстераза	нм—нанометр
ЦНС—центральная нервная система	пг—пикограмм
ЭПР—электронный парамагнитный резонанс	мкатом—микркатом
	ммоль—миллимоль
	мкмоль—микромоль
	нмоль—наномоль
	пмоль—пикомоль
	фмоль—фемтомоль

Примечание. Сокращения для названий ферментов, как например, ГДГ, ГДК, ГФБДГ и т. д., не допускаются. Однако нет возражений против замены названия субстрата, входящего в тривиальное наименование фермента, стандартной аббревиатурой, например: АТРаза, РНКаза, NADH дегидрогеназа, и т. п. Химические элементы следует обозначать символами, а простые неорганические соединения—формулами, например: $MgCl_2$. Символы ионов следует писать так: Mg^{2+} , Cl^- , PO^{3-} .

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Долго-Сабуров В. Б., Подосиновичева Н. П., Санковский А. А.</i> Некоторые механизмы регуляции синтеза и секреции ацетилхолина в холинэргических терминальных мозга	3
<i>Галоян А. А., Чацлян С. Г., Абрамян Г. Э.</i> Роль β 1-тимолина в регуляции Ca^{2+} -кальмодулинзависимых процессов мозга (регуляция активности ФДЭ циклических нуклеотидов)	10
<i>Абрамян Г. Э., Исаджанян М. А., Чацлян С. Г., Киракосова А. С., Галоян А. А.</i> Очистка кальмодулинзависимой ФДЭ циклических нуклеотидов гипоталамуса методом эффинной ВЭЖХ	21
<i>Петросян С. А., Бояджян А. С., Карагезян К. Г., Авакян С. А., Абрамов Р. Е.</i> Очистка и исследование свойств нового белка флавопротеиновой природы из хромаффинных гранул	29
<i>Мовсесян Н. О., Бурназян Л. Б., Арутюнян А. В.</i> Эндогенное АДР-рибозилирование остатков цистеина и гистидина в белках синаптических мембран	41
<i>Кошоридзе Н. И., Адамия М. Ю., Алексидзе Н. Г., Рапава Э. А.</i> Взаимодействие лектина LPM ₉₋₅₀ с Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФазой микросом головного мозга крысы	49
<i>Медведева А. Е., Райгородская Д. И., Горкин В. Э., Федотова Н. Б., Семиохина А. Ф.</i> Модификация каталитических свойств мембраносвязанных моноаминоксидаз головного мозга при перекисном окислении липидов	56
<i>Кривян А. Ю., Гюльбаязян Т. А., Аракелян Л. М., Камалян А. Р., Агабалян М. Л., Камалян Р. Г.</i> Влияние ингибитора ГАМК-трансаминазы O-сульфостаноланамина на показатели гормонально-медиаторного и энергетического обмена при иммобилизации	65
<i>Бардахчян Э. А., Макляков Ю. С., Харданова Н. Г., Куликова О. Н.</i> Ультраструктурные и биохимические основы «микротрубочковой катастрофы», вызванной нейролептиками	72

Краткие сообщения

<i>Григорьянц О. О., Ростовцев А. П., Матвиенко Н. П., Гомазков О. А.</i> Изменения активности энцефалинообразующей карбоксипептидазы H в гипофизе, надпочечниках и стриатуме при воздействии инсулина	80
<i>Потапенко Р. И., Сабко В. Е.</i> Влияние стресса на состав и перекисное окисление липидов в синаптических мембранах головного мозга взрослых и старых крыс	85
<i>Галоян А. А., Гурацц Б. Я.</i> Открытие пептидил-цис-транс-изомеразы в гипоталамусе (новые его функции)	89

Обзоры

<i>Сергеева М. Г., Лещенко З. В., Куликов В. В., Варфоломеев С. Д.</i> Роль иммунной системы в механизмах действия наркотических веществ	93
<i>Кондратьев А. Д., Северин С. Е., Москвитина Е. Л., Посыпанова Г. А., Губин А. Н., Юсупова Р. А., Тусупов О. К., Шмырев И. И., Зотова Е. Е.</i> Системы вторичных мессенджеров в регуляции нейрональной дифференцировки и нейросекреции	107

CONTENTS

<i>Dolgo-Saburov V. B., Podos'noyko A. N. P., Sarkishev A. A.</i> Certain mechanisms of the regulation of acetylcholine synthesis and release in brain cholinergic terminals	6
<i>Ga'oyan A. A., Chailyan S. G., Abrahamyan G. E.</i> The role of β -1-lysozin in the regulation of calcium and calmodulin sensitive processes (regulation of phosphodiesterase activity)	10
<i>Abrahamyan G. E., Isajanyan M. A., Chailyan S. G., Krakosova A. S., Ga'oyan A. A.</i> Purification of bovine hypothalamus calmodulin stimulated phosphodiesterase by affinity high performance liquid chromatography	21
<i>Petrosian S. A., Boyajan A. S., Karageosian K. G., Avakian S. A., Abramov R. E.</i> The purification of a new flavoprotein from chromaffin granules and investigation of its properties	29
<i>Movsessian N. H., Burnasian L. B., Haroutunian A. V.</i> Endogenous ADP-ribosylation of cysteine and histidine residues of synaptic membrane proteins	49
<i>Koshoridze N. I., Adamia M. I., Aleksidze N. G., Rapua E. A.</i> Interaction of lectin PM_{40-60} with Ca^{2+} , Mg^{2+} , ATPase of rats brain microsomes	56
<i>Medvedev A. E., Raigorodskaya D. I., Gorkin V. Z., Fedotova I. B., Semiozhkina R. E.</i> Modification of catalytic properties of brain membrane-bound monoamine oxidases during lipid peroxidation	65
<i>Krimian A. Ju., Gjulbayazian T. A., Araquelian I. M., Kotogian V. A., Agabekian M. L., Kamalian R. G.</i> The influence of the O-sulfoethanolamine on some hormonal and metabolic parameters by rats immobilisation	65
<i>Bardakhchian E. A., Makliakov Yu. S., Kharlanova N. G., Kulikova O. N.</i> Ultrastructural and biochemical basis of "microtubule catastrophe" induced by neuroleptics	72
Short communications	
<i>Grigoriants O. O., Rostovtsev A. P., Matvienko N. N., Gomazkov O. A.</i> Alteration of enkephalin-forming carboxypeptidase H activity in pituitary, adrenal and striatum at the insulin stress	80
<i>Potapenko R. I., Sabko V. E.</i> Composition and peroxidation of lipids in the brain synaptic membranes of adult and old rats	85
<i>Ga'oyan A. A., Gurvits B. Ya.</i> The discovery of peptidyl-cys-trans-isomerase in hypothalamus (its new functions)	89
Reviews	
<i>Sergeeva M. G., Leshchenko Z. V., Kulikov V. V., Varfolomeev S. D.</i> The role of immune system in the mechanisms of drug action	93
<i>Kondratyev A. D., Severin S. E., Moskvitina E. L., Posypanova G. A., Gubin A. N., Yusupova R. A., Tusupov O. K., Shyrev I. I., Zotova E. E.</i> Systems of second messengers mediating processes of neural differentiation and neurotransmitter release	107