

Т. 11, № 2, 1992

ISSN 0203-393X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՂՈՔԻՆԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

НЕЙРОХИМИЯ
ԵՆՏՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 11, ВЫП. 2
АПРЕЛЬ—ИЮНЬ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЕНИИ
ЕРЕВАН

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

А. ЛАЙТА (США)—соредактор

**Н. Ф. АВРОВА, Г. В. АПРИКЯН, Н. Г. АЛЕКСИДЗЕ, А. В. АРУТЮНЯН,
И. П. АШМАРИН, Н. А. БАРХУДАРЯН (отп. секретарь), Р. Н. ГЛЕБОВ.**

К. Г. КАРАГЕЗЯН (зам главного редактора)

**В. С. ОГАНЕСЯН, А. Т. ПИКУЛЕВ, К. С. РАЕВСКИЙ, Г. С. ХАЧАТРЯН,
В. ВОЛЬТЕР (Германия), К. ХЕЙЦМАН (Швейцария), ДЖ. ХАШИМ (США)**

Редакционный совет

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

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

Сдано в набор 19.06.1992 г. Подписано к печати 09.07.1992 г.
Формат: 70×108^{1/16} Бумага № 1 «смирновская». Высокая печать.
Печ. лист. 8,0. Усл.-печ. лист. 11,2. Усл. др. от. 11,2. Учет.-вал. 8,95.
Тираж 485. Заказ 95. Издат. 8032. Цена 100 р.
Адрес редакции: 375044, Ереван, ул. П. Савана 5/1.
Издательство АН Армения, 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—100 руб.

РЕДКОЛЛЕГИЯ

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

АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
СИНТЕТИЧЕСКОГО ФРАГМЕНТА (11—19) С-МОДУЛИНА 3
С КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМОЙ ФДЭ
ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ ГИПОТАЛАМУСА

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

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

Настоящей работой установлено, что активным участком молекулы С-модулина 3 является фрагмент 11—19, обладающий высоким сродством к молекуле кальмодулинзависимой ФДЭ гипоталамуса. Взаимодействие фрагмента с ферментом приводит к существенной стимуляции гидролиза сАМР: степень активации ФДЭ сравнима с таковой для индуцированной кальмодулином активности ФДЭ. На молекуле ФДЭ предполагается существование некоего центра, отличного от кальмодулинрегуляторного и способного взаимодействовать с Ca^{2+} -независимыми модуляторами.

Ионы кальция—важнейшие регуляторы клеточных метаболических процессов. Они, как и циклические нуклеотиды, ответственны за запуск многих ферментативных механизмов, обеспечивающих жизнедеятельность клетки. Действие Ca^{2+} опосредовано через Ca^{2+} -связывающие белки парвальбуминового ряда, характерной чертой которых является наличие в них специфических Ca^{2+} -связывающих центров. Одним из основных представителей этого семейства является кальмодулин, который, связываясь с Ca^{2+} , способен активировать многие важнейшие ферментативные системы, например, аденилатциклазу, ФДЭ циклических нуклеотидов, киназу легких цепей миозина, Ca^{2+}/Mg^{2+} -АТФазу и т. д. [1].

Между тем, регуляторная функция кальмодулина внутри клетки лимитирована, поскольку известно, что образование активного комплекса Ca^{2+} -кальмодулин возможно лишь при увеличении внутриклеточного содержания Ca^{2+} до 10^{-5} М, в то время как в интактной клетке оно может колебаться в пределах 10^{-7} М, что исключает участие кальмодулина как внутриклеточного регулятора [2], вызывая в то же время недоумение в связи с обнаруживаемым в нормально функционирующем мозгу высокой активности многих чувствительных к кальмодулину ферментативных систем. В связи с вышесказанным, не исключено, по-видимому, существование альтернативного механизма регуляции клеточной активности как возможного заместителя многих функций, приписываемых кальмодулину при лимитированном внутриклеточном уровне Ca^{2+} . Иными словами проблема ком-

пенсаии регуляторной функции кальмодулина в данной ситуации Ca^{2+} -независимыми механизмами становится наиболее актуальной.

В этой связи несомненный интерес представляют обнаруженные впервые в 1986 г. Галояном и соавт. в гипоталамусе крупного рогатого скота ранее неизвестные нейропептиды под общим названием С-модулины, проявляющие высокое сродство к кальмодулинстимулируемым ферментам в отсутствие Ca^{2+} . На примере ФДЭ циклических нуклеотидов было показано, что С-модулины проявляли значительное сходство в регуляторной активности с кальмодулином. Однако, в отличие от последнего, процесс стимуляции гидролиза циклических нуклеотидов носил Ca^{2+} -независимый характер [3, 4]. В дальнейшем было показано участие С-модулинов в регуляции активности и других Ca^{2+} -кальмодулинзависимых ферментов, таких, например, как киназа легких цепей миозина, кальмодулинстимулируемая протеникиназа, 5'-нуклеотидаза и др. [5].

С использованием масс-спектрального анализа и микросеквенирования была полностью расшифрована первичная структура двух С-модулинов. Молекула одного из них была идентифицирована как тимозин $\beta 4$ (1—39) [5]. Была высказана гипотеза о причастности С-модулинов гипоталамуса к регуляторной системе нервной и мышечной тканей, ответственной за обеспечение функциональной активности интактной клетки. Значительный интерес представляет выявление участков молекулы С-модулина 3, реализующего действие этого регуляторного нейропептида. В этой связи были синтезированы фрагменты нативной молекулы С-модулина 3. Детальному изучению механизма Ca^{2+} -независимого взаимодействия синтетического фрагмента (11—19) молекулы С-модулина 3 с кальмодулинстимулируемой ФДЭ циклических нуклеотидов гипоталамуса и посвящено настоящее исследование.

Материалы и методы

В работе были использованы cAMP, cGMP, ЭГТА, препараты кальмодулина 5-нуклеотидазы из яда *Opheophagus Hannah* («Sigma», США), Dowex 1×2, трис-HCl, $MgCl_2$, $CaCl_2$, Na_2N_3 («Serva», ФРГ), Phenyl-Sephарose («Pharmacia», Швеция), $8[^3H]cAMP$, $8[^3H]cGMP$ и остальные реактивы отечественного производства квалификации ос. ч.

Эксперименты проводили на двухкомпонентной системе ВЭЖХ «Biotronik BT-8100» (ФРГ). Система оснащена инжектором «Rheodyne» с петлей для образца объемом 10 мкл и детектором с изменяемой длиной волны. Спектральный диапазон дейтерисвой 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-1000 CaM-Biosphere:

(7,5×80 мм) и одноразовый концентрирующий патрон сАМВ-Biosphere («Bioservis», Армения).

Активность ФДЭ определяли по методу Thompson, Appleman [6] с применением меченого $8[^3\text{H}]\text{cAMP}$ или $8[^3\text{H}]\text{cGMP}$. Инкубационная смесь (200 мкл) содержала 50 мМ трис-НСl, рН 7,0, 10 мМ MgCl_2 , 2 мМ CaCl_2 или 2 мМ ЭГТА, 100 кБк $8[^3\text{H}]\text{cAMP}$ или $8[^3\text{H}]\text{cGMP}$, 5 мМ β -меркаптоэтанол и 5 мкМ сАМР. Реакцию начинали добавлением фермента. Через 5—15 мин инкубации при 30° пробы кипятили 1,5 мин, охлаждали до 30° и добавляли в них 0,2 мг/мл раствора 5'-нуклеотидазы яда *Orpheorhagus Nazari*. Реакцию, катализируемую этим ферментом, проводили при 30° в течение 10 мин. Сорбцию негидролизованного субстрата осуществляли на анионообменнике Dowex 1×2 (Cl-форма), добавляя 1 мл суспензии смолы (1/2) в среду инкубации. После перемешивания пробы центрифугировали 5 мин при 12000 g, 0,3 мл супернатанта помещали в 5 мл сцинтиллятора ЖС-7 и проводили измерения радиоактивности на жидкостном сцинтилляционном спектрометре «Intertechnique 2000» (Франция). Скорость ферментативной реакции выражали в относительных единицах активности (о.е.а)—процент гидролиза субстрата/концентрация субстрата в пробе за 1 мин/1 мкл фермента.

Очистку кальмодулинзависимой ФДЭ проводили по ранее описанному методу [7]. Измельченную ткань гипоталамуса (100 г), хранящуюся 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 азид натрия, 1%-ную антипенную эмульсию и 1 мМ РМSP) при 4° на гомогенизаторе «Политрон». Гомогенат центрифугировали в течение 60 мин при 24000 g, («Beckman G-21», ротор JA-14, США). В супернатант добавляли раствор CaCl_2 в конечной концентрации 2 мМ и наносили на колонку Phenyl-Sepharose (15×200 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 составляла 2 мл/мин. Контроль осуществляли по изменению оптической плотности (λ 280 нм) и активности ФДЭ. Все операции проводили при 4° жидкостным хроматографом высокого давления «Кнауег» (ФРГ).

Элюат с Phenyl-Sepharose, обладающий наибольшей ферментативной активностью (30 мл), концентрировали на ультрафильтраторе («Amicon», США), мембрана РМ-30 («Pellicon membrane 30000», США). Давление в ячейке поддерживали на уровне 3,5 атм. при 0°. 1 мл образца наносили на tandemную систему последовательно соединенных аффинных ВЭЖХ колонок Si-1000 CaM-Biosphere (7,5×80 мм), где в качестве неподвижной фазы применяли иммобилизованный кальмодулин. Систему предварительно уравновешивали 0,1 М фосфатным буфером С, рН 7,0, содержащим 0,5 М сульфат аммония, 2 мМ CaCl_2 , 0,1 мМ ЭГТА и 10%-ный глицерин. Колонки промывали тем же буфером, после чего первую колонку отсоединяли и регене-

рировали. Колонку 2 промывали пятью объемами буфера С, содержащего 0,1%-ный Brij 35 и дополнительно десятью объемами буфера С. Через инжектор на колонку наносили 1 мл буфера D, (0,1 M Na -фосфат, pH 7,0, содержащего 5 mM MgCl_2 , 5 mM ЭГТА, 0,5 M сульфата аммония и 20%-ный глицерин) и останавливали поток. Через 20 мин элюцию ФДЭ с колонки 2 на одноразовый концентрирующий патрон cAMP Biosphere осуществляли в режиме линейного градиента сульфата аммония от 0,5 до 0 M в присутствии 2 mM ЭГТА и 20%-ного глицерина при скорости потока 0,8 мл/мин за 60 мин. Концентрирующий одноразовый патрон отсоединяли и хранили при температуре -20° в 45%-ном глицерине 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 mM натрий-ацетатный буфер, pH 4,5, содержащий 0,5 M NaCl , 10 mM ЭДТА и 6 M мочевины) с последующей промывкой десятью объемами воды и буфера С.

Результаты и обсуждение

Аффинная ВЭЖХ может служить не только методом препаративного выделения ФДЭ циклических нуклеотидов, но быть гибким аналитическим методом, так как степень хроматографического удерживания подвижного реагирующего вещества на иммобилизованном лиганде позволяет определять равновесную константу связывания для взаимодействия аффинной матрицы с подвижным компонентом [8]. Кроме того, если в ходе зонального элюирования в подвижную фазу включаются биологически активные вещества, влияющие на связывание с аффинной матрицей путем прямого взаимодействия с элюирующим подвижным компонентом (например, вследствие конкуренции с иммобилизованным ферментом), то могут быть измерены также параметры взаимодействия этих эффикторов. И поскольку для аффинной матрицы можно варьировать конкурирующие вещества и другие эффикторы, а также химическую природу подвижного аффината, то могут быть определены специфичность связывания и его зависимость от влияния различных биоактивных соединений. Поэтому константы связывания для иммобилизованного лиганда можно сравнить с таковыми для растворимого аналога. Сопоставление взаимодействий в случае аффинной матрицы и раствора может быть использовано для конструирования модели и оценки механизма регуляции ферментативной активности ФДЭ. Основываясь на вышеизложенном, провели серию экспериментов по изучению межмолекулярного взаимодействия синтетического фрагмента (11—19) молекулы С-модулина 3 и кальмодулинстимулируемой ФДЭ гипоталамуса.

На рис. 1, а представлены результаты, полученные при элюировании зон синтетического фрагмента с колонки PDE-Biosphere. Как видно из хроматограммы, элюция в режиме линейного градиента

NaCl от 0 до 1 М приводит к появлению пика в области высоких концентраций элюента (0,75 М). Следовательно, можно предположить, что лишь значительное увеличение ионной силы элюента изменяет гидрофобные свойства синтетического фрагмента, что приводит к потере способности пептида связываться с иммобилизованным ферментом и с последующей его элюцией. Иными словами, можно говорить о высоком средстве синтетического

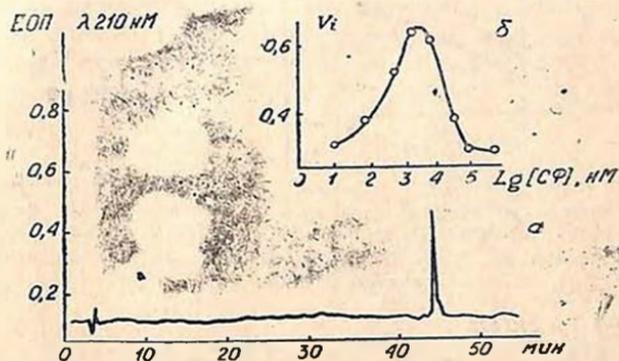


Рис. 1. Аффинная ВЭЖХ синтетического фрагмента (11—19) С-модулина 3 на колонке PDE-Biosphere (4,6.150 мм). Элюцию осуществляли в режиме линейного градиента NaCl от 0 до 1 М в 25 мМ трис-HCl буфере, pH 7,0, содержащем 2 мМ ЭГТА, 5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ азид натрия, 1 мМ дитиотрептола, со скоростью потока 0,5 мл/мин при 30°. Обнаружение продукта при λ 220 нм. В правом верхнем углу представлен график зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации синтетического фрагмента (11—19) С-модулина 3 в нмоль. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ ЭГТА при концентрации субстрата сАМР 5 мкМ

фрагмента (11—19) С-модулина 3 к молекуле ФДЭ, что подтвердилось экспериментами кинетического анализа, результаты которого представлены на рис. 1 б. Из графика зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации синтетического фрагмента следует, что последний оказывает двухфазное влияние на скорость гидролиза сАМР. Активация на диапазоне малых концентраций сменяется ингибированием в области его насыщающих концентраций. При увеличении концентрации субстрата кажущаяся константа активации (K_a) не возрастает (рис. 2, а). Величина K_a , определенная в координатах Хилла, равна 10 нм (рис. 2, б) и практически совпадает с величиной K_d для нативной молекулы С-модулина 3.

Для уточнения механизма взаимодействия синтетического пептида с ферментом был проведен хроматографический и кинетический анализ с использованием негидролизруемых структурных аналогов сАМР и сGMP соответственно сАМР (Вt)₂ 135 и сGMP (Вt)₂.

На рис. 3, а представлены результаты аффинной ВЭЖХ на ко-

лонке PDE-Biosphere. Как видно из хроматограммы, элюция буфером, содержащим, сАМР (В1)₂, не приводит к появлению пика, фиксируемого при λ 210 нм. Иными словами, конкуренция пептида за каталитический центр на поверхности фермента мало вероятна, по-

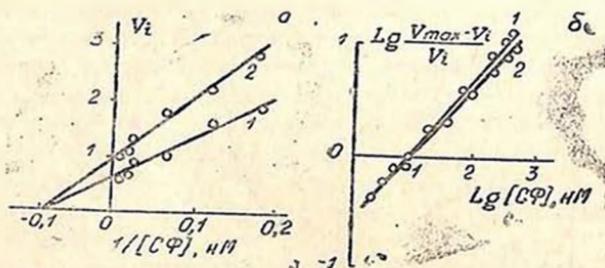


Рис. 2. График зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации синтетического фрагмента в присутствии двух фиксированных концентраций сАМР. а: 1—5 мкМ, 2—50 мкМ. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ ЭГТА. Та же зависимость представлена в координатах Хилла (б)

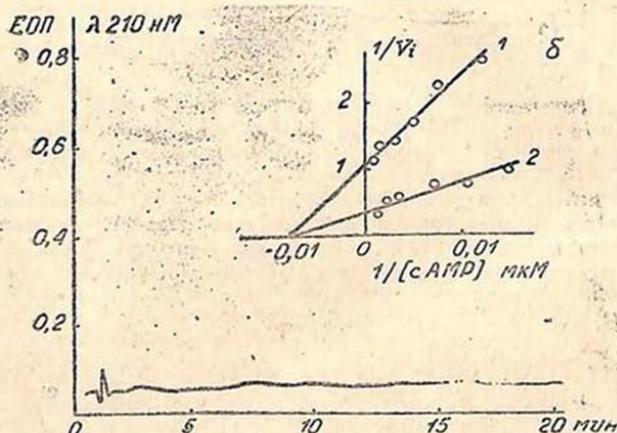


Рис. 3. Аффинная ВЭЖХ синтетического фрагмента (11—19) С-модуля 3 на колонке PDE-Biosphere (4,6×150 мм). Элюцию осуществляли в изократическом режиме 25 мМ трис-НСl буфером, рН 7,0, содержащим 2мМ ЭГТА, 5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ азид-натрия, 1мМ дитиотрептола и 100 мкМ сАМР (В1)₂ со скоростью потока 0,5 мл/мин при 30°. Обнаружение продукта при λ 220 нм. В правом верхнем углу представлена зависимость начальной скорости гидролиза сАМР, индуцированной под действием синтетического фрагмента. Эксперимент проведен в присутствии 0,2 мМ ЭГТА и двух фиксированных концентраций активатора 100 нм (верхняя кривая) и 10 нм (нижняя кривая)

скольку одновременно выполняются два следующих условия: если бы в ходе зонального элюирования включенный в подвижную фазу аналог субстрата влиял на связывание пептида путем прямого взаимодействия с иммобилизованной ФДЭ, например, вследствие конку-

рениции за центр носадки, то насыщающие концентрации сАМР(Vt)₂ неизбежно привели бы к элюции пептида с колонки. Однако в наблюдаемом случае десорбция пептида (10 нМ) неосуществима даже при концентрации аналога сАМР 100 мкМ, и средство субстрата к ферменту по активному центру ФДЭ остается неподверженным действию синтетического фрагмента при высоких его концентрациях. Последний вывод сделан с привлечением данных, представленных на рис. 3, а, из которого следует, что действие нонапептида приобретает некокурентный характер по отношению к субстрату и направлено только на изменение скорости гидролиза сАМР.

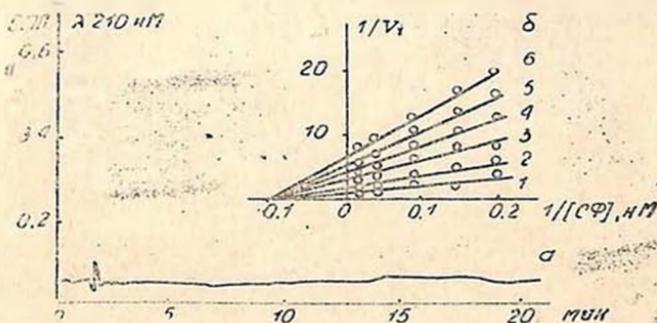


Рис. 4. Аффинная ВЭЖХ синтетического фрагмента (11—19) С-модулина 3 на колонке PDE-Biosphere (4,6×150 мм). Элюцию осуществляли в изократическом режиме 25 мМ трис-НСl буфером, рН 7,0, содержащим 2 мМ ЭГТА, 5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ азид-натрия, 1 мМ дитиотрептола, 200 мкМ сGMP (Vt)₂ со скоростью потока 0,5 мл/мин при 30°. Обнаружение продукта при λ 220 нм. В правом верхнем углу представлен график зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации активатора в присутствии фиксированных концентраций сGMP, разных (в мкМ): 1—0, 2—1, 3—10, 4—100, 5—500, 6—1000 в двойных обратных координатах. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ ЭГТА при концентрации субстрата сАМР 5 мкМ

Для проверки действия пептида на регуляторный сGMP-связывающий центр молекулы фермента проведен эксперимент, результаты которого представлены на рис. 4, а. Согласно хроматограмме, сGMP-зависимая элюция не приводит к появлению в профиле элюции пика. Как и в случае сАМР, сделан вывод о некокурентном типе взаимодействия, что подтверждается результатами кинетического анализа, представленными на рис. 4, б. Согласно полученным данным, сGMP не влияет на средство активатора к ферменту и величина K_i, равная 10 нМ, остается неизменной при существенном уменьшении скорости гидролиза сАМР. Таким образом, исключается также возможность связывания пептида через сGMP-регуляторный центр.

Для уточнения характера активации ФДЭ под действием синтетического фрагмента в присутствии кальмодулина рассмотрим результаты эксперимента, представленные на рис. 5.

График зависимости активности фермента под действием кальмодулина в присутствии фиксированных концентраций синтетического фрагмента, приведенный на рис. 5, б, показывает, что степень активации ФДЭ под действием кальмодулина в сочетании с синтетическим фрагментом выше, чем тот же параметр для активации ФДЭ комплексом Ca^{2+} -кальмодулин. При этом кажущаяся величина K_a фермента под действием кальмодулина, равная 2 нМ, остается неизменной, следовательно, влияние синтетического фрагмента и каль-

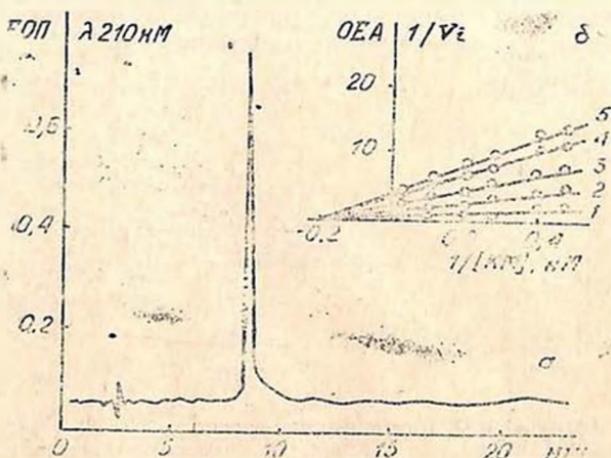


Рис. 5. Аффинная ВЭЖХ синтетического фрагмента (11—19) С-модулина 3 на колонке СаМ-Biosphere (4,6×150 мм). Элюцию осуществляли в изократическом режиме 25 мМ трис-НСI буфером, рН 7,0, содержащим 2 мМ ЭГТА, 5 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ азид-натрия, 1 мМ дитиотрептола со скоростью потока 0,5 мл/мин при 30°. Обнаружение продукта при λ 210 нм. В правом верхнем углу представлен график зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации кальмодулина в присутствии фиксированных концентраций синтетического фрагмента, равных (в нМ): 1—1000, 2—100, 3—10, 4—1, 5—0 в двойных обратных координатах. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ CaCl_2 при концентрации сАМР 5 мкМ

модулина на активность ФДЭ носит аддитивный характер. Можно предположить, что связывание синтетического фрагмента и кальмодулина с молекулой ФДЭ, по всей вероятности, носит некооперативный характер. Однако не исключается возможность образования активного комплекса пептид-кальмодулин, способного также индуцировать стимуляцию гидролиза сАМР. Поэтому было предпринято специальное исследование с привлечением аффинной ВЭЖХ колонки, где в качестве неподвижной фазы применялся иммобилизованный кальмодулин. Результаты хроматографии представлены на рис. 5, а. Как видно из хроматограммы, как в присутствии, так и в отсутствие ионов Ca^{2+} , элюция синтетического фрагмента с колонки СаМ-Biosphere достигается уже при незначительном изменении элюирующей силы. Поэтому маловероятно, что синтетический фрагмент обладает

сколь-нибудь специфическим средством к молекуле кальмодулина, и связывание с иммобилизованным биорегулятором является следствием неспецифической сорбции на поверхности лиганда за счет ее гидрофобности.

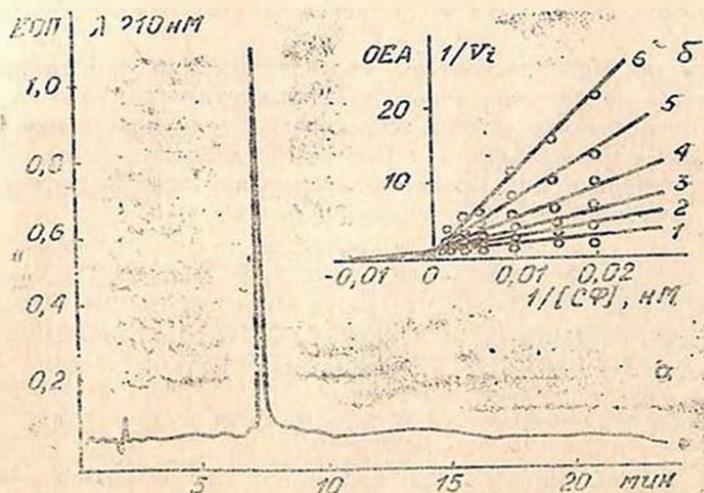


Рис. 6. Аффинная ВЭЖХ синтетического фрагмента (11—19) С-модулина на колонке PDE-Biosphere (4,6×150 мм). Элюцию осуществляли в изократическом режиме 25 мМ трис-НСI буфером, рН 7,0, содержащим 2 мМ ЭГТА, 5 мМ MgCl₂, 0,1 мМ азид-натрия, 1 мМ дитиотрептола и 500 мкМ фосфатидилсерина, со скоростью потока 0,5 мл/мин при 30°. Обнаружение продукта при λ 210 нм. В правом верхнем углу представлен график зависимости начальной скорости гидролиза сАМР от концентрации активатора в присутствии фиксированных концентраций фосфатидилсерина, равных (в мкМ): 1—0, 2—1, 3—10, 4—100, 5—500, 6—1000 в двойных обратных координатах. Эксперимент проведен в присутствии 2 мМ ЭГТА при концентрации сАМР 5 мкМ.

С использованием аффинной ВЭЖХ с зональным элюированием была изучена взаимодействующая трехкомпонентная система синтетический фрагмент-ФДЭ-фосфатидилсерин. На рис. 6, а представлены результаты, полученные при элюировании зон синтетического фрагмента с колонки PDE-Biosphere при различных концентрациях фосфатидилсерина в элюирующем буфере. Линейность зависимости $1/V_0 - V_0$ от концентрации фосфатидилсерина отражает природу конкурентного взаимодействия с молекулой ФДЭ. Эта зависимость была использована для расчета величины K_d комплекса ФДЭ-синтетический фрагмент, которая практически совпадает с величиной K_d для модулятора в кинетических экспериментах (рис. 6, б). Зависимость активности ФДЭ в присутствии различных концентраций фосфатидилсерина от концентрации синтетического фрагмента (рис. 6, б) линейна, что свидетельствует об отсутствии кооперативности. Эффективная константа сродства пептида с ФДЭ, равная 10 нМ, увеличивается с ростом концентрации фосфатидилсерина, одновременно мак-

симальная скорость гидролиза претерпевает лишь незначительное изменение. Представленный на рис. 6, б эффект действия фосфатидилсерина следует отнести к случаю классического конкурентного ингибирования. Следовательно, можно говорить о существовании единого центра связывания Ca^{2+} -независимых регуляторов на молекуле ФДЭ.

Таким образом, результаты проведенных наблюдений позволяют заключить о наличии на молекуле кальмодулинстимулируемой ФДЭ гипоталамуса некоего центра, способного взаимодействовать с Ca^{2+} -независимыми регуляторами. Внутримолекулярная связь подобного центра направлена на стимуляцию гидролиза циклических нуклеотидов при лимитированной концентрации Ca^{2+} .

THE ANALYSIS OF PARAMETERS OF THE INTERACTION OF THE SYNTHETIC FRAGMENT (11—19) OF C-MODULIN 3 WITH CALMODULIN-DEPENDENT CYCLIC NUCLEOTIDES PHOSPHODIESTERASE OF HYPOTHALAMUS

ABRAHAMIAN G. E., ISADJANIAN M. A., CHAILIAN S. G., KIRAKOSOVA A. S., GALOYAN A. A.

H. Ch. Buntatian Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia Yerevan

In this paper it is shown that the active part of C-modulin 3 molecule is the fragment 11—19, possessing high affinity to CaM-dependent PDE molecule of the hypothalamus. The interaction of the fragment with the enzyme brings to the essential stimulation of cAMP hydrolysis: the level of PDE activity can be compared with the one for PDE activity induced by CaM.

It is supposed the existence of a center on PDE molecule different from CaM-regulating and able to interact with Ca^{2+} -independent modulators.

ЛИТЕРАТУРА

1. La Porte D. C., Wierman B. M., Storn D. R. Biochemistry, v. 19, p. 3314—3319, 1980.
2. Wasserman R. H.—In: Novel calcium-binding proteins (ed. C. W. Heizman), p. 7—13. Springer-Verlag, Berlin, 1991.
3. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гуроцц Б. Я., Абрамян Г. Э. Нейрохимия, т. 9, № 4, с. 450—459, 1990.
4. Галоян А. А. Нейрохимия, т. 9, № 2, с. 273—286, 1990.
5. Galoyan A. A., Gurots B. Ya., Shatalova N. A., Shale'y R., Lee M. Neurochem. Research, v. 17, № 8, p. 773—777, 1992.
6. Thompson W. J., Appleton M. M. Biochemistry, v. 19, p. 311—318, 1971.
7. Абрамян Г. Э., Исаджанян М. А., Чалян С. Г., Киракосова А. С., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 10, № 3, 4, 1991.
8. Абрамян Г. Э., Чалян С. Г., Исаджанян М. А., Киракосова А. С., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 11, № 2, 1991.

Поступила 22. V. 1992

УДК 577.152.313.16

ИССЛЕДОВАНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ НАТИВНЫХ
И СИНТЕТИЧЕСКИХ КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИХ ПЕПТИДНЫХ
ФАКТОРОВ НА АКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИНЕЙРИНА

БАРСЕГЯН К. С., БАРХУДАРЯН Н. А., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии им. Г. Х. Буянтяна НАН Армении, Ереван

Исследовано воздействие нативных (ПФ₁₋₅) и синтетических (СП₁₋₄) коронаросуживающих пептидных факторов на активность Ca²⁺-кальмодулинзависимой фосфопротенинфосфатазы (кальцинейрина). Активность фермента определяли с помощью чувствительного флуорометрического метода, используя в качестве субстрата 4-метилумбеллиферилфосфат (4-МУФ). Обнаружено, что как нативные, так и синтетические пептиды являются ингибиторами кальцинейрина с K₁ для нативных пептидов от 1.9·10⁻⁹ М до 2.8·10⁻⁹ М и с K₁ от 2.5·10⁻⁹ М до 3.1·10⁻⁹ М для синтетических пептидов. Показано, что при исследовании кооперативного воздействия коронаросуживающих пептидов и трифторперазина на активность кальцинейрина происходит уменьшение ингибиторного эффекта как ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄, так и трифторперазина на активность фермента. Высказывается предположение о возможном участии ПФ₁₋₅ в регуляции активности кальцинейрина и в условиях *in vivo*.

Фосфорилирование и дефосфорилирование белков, вызывая конформационные изменения в их молекуле и, тем самым, модифицируя их биологические свойства, являются одним из основных механизмов, регулирующих многие важнейшие процессы, протекающие в клетке: сокращение мышц, мембранный транспорт, секрецию и др. [1]. Следует отметить, что эти процессы являются сопряженными: степень фосфорилированности белков определяется соотношением соответствующих протенинкиназ и протенинфосфатаз [2]. Поэтому, обнаружив, что коронаросуживающие пептидные факторы (ПФ₁₋₅), выделенные из гипоталамуса крупного рогатого скота [3], вызывают Ca²⁺-независимое активирование киназы легких цепей миозина (КЛЦМ) [4—6] путем Ca²⁺-независимого связывания с кальмодулином [7, 8], мы сочли необходимым изучить воздействие ПФ₁₋₅ также и на активность Ca²⁺-кальмодулинзависимой фосфопротенинфосфатазы (ФПаза)-кальцинейрина.

Кальцинейрин или ФПаза 2В (составляет 1% от общего белка мозга) связывает 1 моль кальмодулина на моль фермента, проявляя весьма высокое сродство (K_d=0,1 нМ). Кальмодулины активируют фермент в 5—10 раз [1, 9]. Кальцинейрин состоит из двух субъединиц

нии (СЕ) А и В. СЕ А с M_r 61 кД содержит каталитический и кальмодулинсвязывающий участки [10, 11]. СЕ В с M_r 19 кД представляет собой Ca^{2+} -связывающий компонент [12, 13] и имеет высокую степень гомологии с кальмодулином (35%) [14]. В аминокислотной последовательности СЕ В выявлено наличие 4-х Ca^{2+} -связывающих участков в виде «EF hand» доменов—генетически детерминированных участков, характерных для семейства Ca^{2+} -связывающих белков [15, 16].

Факт наличия в аминокислотной последовательности СЕ В гомологии с кальмодулином представлял особый интерес, так как не исключал возможности воздействия PF_{1-5} , обладающих высоким сродством к кальмодулину ($K_d=2-10$ нМ), на активность кальцинейрина как через связывание с кальмодулином, так и путем прямого воздействия на фермент через связывание с СЕ В.

В 1990 г. нами была установлена первичная структура 3-х из PF_{1-5} , которые оказались фрагментами 33—37, 33—38 и 32—38 β -цепи гемоглобина [6, 17]. Было высказано предположение, что и остальные 2 пептида с невыявленной первичной структурой являются фрагментами β -цепи гемоглобина, отличающиеся от структуры вышеуказанных пептидов лишь длиной пептидной цепи. Методом твердофазного синтеза были получены синтетические пептиды $СП_1$ (LVVYRWTQF) и $СП_2$ (LVVYRWTQ), представляющие фрагменты 32—41 и 32—39 β -цепи гемоглобина и изучено их влияние, а также воздействие 2-х других синтетических пептидов— $СП_3$ (LVVYRWT) и $СП_4$ (VVYRWT), соответствующих по структуре PF_3 и PF_2 соответственно, на тест-системы, специфичные для PF_{1-5} . Полученные результаты указывали на некоторую идентичность свойств нативных и синтетических пептидов [17].

В данной работе сообщается об изучении влияния нативных (PF_{1-5}) и синтетических ($СП_{1-4}$) коронаросуживающих пептидных факторов на активность кальцинейрина. Учитывая тот факт, что PF_{1-5} изменяли чувствительность кальмодулина к трифторизазину (ТФП)—известному антагонисту кальмодулина [7, 8], представлялось интересным изучить также кооперативный эффект коронаросуживающих пептидов и ТФП на активность кальцинейрина.

Материалы и методы

PF_{1-5} выделяли по методу Галояна и соавт. [3] из гипоталамуса быка.

Высокоочищенные препараты кальцинейрина получали из мозга крупного рогатого скота по методам Sharma и соавт. [18] и Tallant и соавт. [19] с некоторыми модификациями. Чистоту полученных препаратов проверяли электрофорезом в 7,5—15%-ном ПААГ в присутствии 0,1%-ного ДДС-На и 1 мМ ЭГТА по методу Laemmli [20].

Активность кальцинейрина определяли, используя чувствительный флуорометрический метод Anthony и соавт. [21]. В качестве субст-

рата был использован 4-метилумбеллиферилфосфат (4-МУФ), синтезированный в нашей лаборатории Я. Возным. Измерение активности фермента проводили в пробе, объемом 1 мл, содержащей 50 нМ трис-НСI буфер, рН 7,5, БСА (1 мг/мл), 0,5 мМ ДТТ, 1 мМ MgCl₂, 0,3 мМ CaCl₂, 360 нМ кальмодулина, 1 мкМ 4-МУФ и необходимое количество фермента (12,5—25 нМ). Пробы инкубировали 1 ч при 32°. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 30%-ной ТХУ. После центрифугирования при 5000 г рН проводили до 8,0 добавлением 0,5 мл 1 М трис. Количество образовавшегося 4-метил-

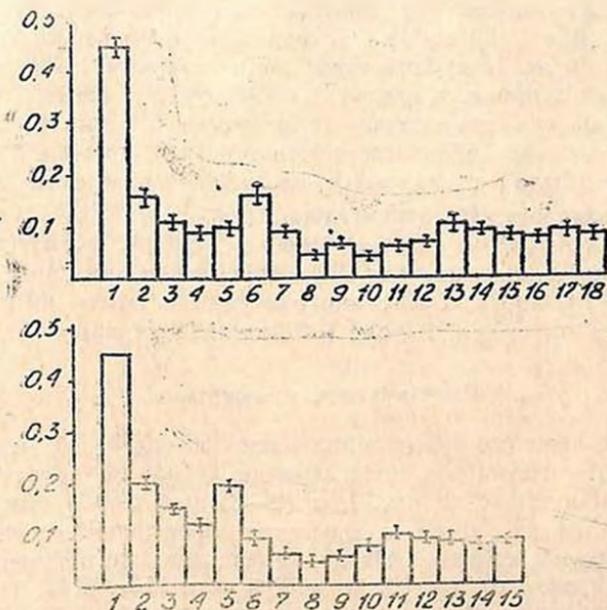


Рис. 1. а. Влияние коронаросуживающих пептидных факторов (ПФ₁₋₅), выделенных из гипоталамуса крупного рогатого скота на активность кальцинейрина. Пептиды использовали в концентрации 10 нМ. 1—контроль 1 (К₁), содержащий 0,3 мМ CaCl₂, 360 нМ кальмодулина (КМ), 12,5 нМ кальцинейрина; 2—К₁+ПФ₁; 3—К₁+ПФ₂; 4—К₁+ПФ₃; 5—К₁+ПФ₄; 6—К₁+ПФ₅; 7—контроль 2 (К₂), содержащий 1 мМ ЭГТА+360 нМ КМ+12,5 нМ кальцинейрина; 8—К₂+ПФ₁; 9—К₂+ПФ₂; 10—К₂+ПФ₃; 11—К₂+ПФ₄; 12—К₂+ПФ₅; 13—контроль 3 (К₃), содержащий 1 мМ ЭГТА+12,5 нМ кальцинейрина; 14—К₃+ПФ₁; 15—К₃+ПФ₂; 16—К₃+ПФ₃; 17—К₃+ПФ₄; 18—К₃+ПФ₅

б. Влияние синтетических пептидов (СП₁₋₄) на активность кальцинейрина. Пептиды использовали в концентрации 10 нМ. 1—контроль 1 (К₁), содержащий 0,3 мМ CaCl₂, 360 нМ КМ, 12,5 нМ кальцинейрина; 2—К₁+СП₁; 3—К₁+СП₂; 4—К₁+СП₃; 5—К₁+СП₄; 6—контроль 2 (К₂), содержащий 1 мМ ЭГТА+360 нМ КМ+12,5 нМ кальцинейрина; 7—К₂+СП₁; 8—К₂+СП₂; 9—К₂+СП₃; 10—К₂+СП₄; 11—контроль 3 (К₃), содержащий 1 мМ ЭГТА+12,5 нМ кальцинейрина; 12—К₃+СП₁; 13—К₃+СП₂; 14—К₃+СП₃; 15—К₃+СП₄

умбеллиферона (4-МУ) определяли флуорометрически на спектрофлуорометре фирмы «Perkin-Elmer MPF-44A» (США). Флуоресценцию измеряли при 445 нм (возбуждение при 365 нм). В качестве контроля служили субстрат и фермент, инкубированные раздельно. За единицу активности фермента принимали такое его количество, которое вызывало в течение 1 ч при 32° образование 4-МУ, соответствующее по флуоресценции 0,1 нМ 4-МУ.

Количество белка определяли по методу Lowry и соавт. [22].

Величины K_i для кальцинейрина относительно ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ были определены по методу Диксона. Использовали две концентрации 4-МУФ (0,7 и 1,4 мкМ) и следующие концентрации пептидов: 1; 2,5; 5; 10; 15 нг. Инкубационная смесь объемом 1 мл содержала 12,5 нМ кальцинейрина. Фермент и исследуемый пептид инкубировали 10 мин при комнатной температуре в присутствии Ca²⁺ и кальмодулина, затем добавляли субстрат и инкубировали 1 ч при 32°.

В работе были использованы следующие реактивы: CNBr-активированная сефароза 4В, кальмодулин («Sigma», США), TSK ДЭАЭ Тоуорепл 650 М («Тоуо Soda», Япония), ЭГТА, Кумасси R-250, акриламид, бис-акриламид, TEMED, персульфат аммония, ДДС-Na («Sigma», ФРГ), MgCl₂, CaCl₂, ацетонитрил («Merck», ФРГ). Остальные реактивы марок х.ч. и ос.ч. («Союзхимреактив»).

Результаты и обсуждение

Было исследовано воздействие нативных (ПФ₁₋₅) и синтетических (СП₁₋₄) пептидов в концентрации 10 нМ на активность кальцинейрина. Как видно из рис. 1, а (2—6) и б (2—5) как нативные, так и синтетические пептиды вызывали значительное ингибирование активности кальцинейрина. Нативные пептиды ингибировали активность фермента на 87, 94, 99, 98 и 85% для ПФ₁, ПФ₂, ПФ₃, ПФ₄ и ПФ₅ соответственно. Синтетические пептиды СП₁, СП₂, СП₃ и СП₄ ингибировали активность фермента на 76, 87, 94, 77% соответственно (данные относительно ингибирующего воздействия ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ приведены с вычетом базальной активности фермента, определенной в отсутствие Ca²⁺ и кальмодулина в инкубационной среде). Следует отметить, что наибольшим ингибирующим воздействием на активность кальцинейрина обладали ПФ₃ и соответствующий ему по структуре СП₃. Эти пептиды снижали активность фермента до уровня базальной активности.

Были определены величины K_i (рис. 2) для кальцинейрина относительно ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄. Оказалось, что ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ имеют близкие величины K_i . Величина K_i для ПФ₁₋₅ находится в диапазоне от $1,9 \cdot 10^{-9}$ М до $2,8 \cdot 10^{-9}$ М; для СП₁₋₄ величина K_i находится в диапазоне от $2,5 \cdot 10^{-9}$ М до $3,1 \cdot 10^{-9}$ М.

Учитывая обнаруженную нами ранее способность ПФ₁₋₅ вызывать Ca²⁺-независимое активирование КЛЦМ и кальмодулинчув-

ствительной ФДЭ сАМР [4—6] путем Ca^{2+} -независимого связывания с молекулой кальмодулина [7, 8], исследовали влияние как ПФ₁₋₅, так и СП₁₋₄ на активность кальцинейрина в отсутствие Ca^{2+} . Инкубационная среда содержала при этом кальмодулин и 1 мМ ЭГТА. Как видно из рис. 1, а (8—12) и б (7—10), ПФ₁, ПФ₂, ПФ₃, ПФ₄, ПФ₅ ингибируют активность фермента (которая в данном случае равна базальной активности кальцинейрина, определенной в отсутствие Ca^{2+} и кальмодулина) в отсутствие Ca^{2+} , но в присутствии кальмодулина (360 нМ) на 54, 24, 59, 33 и 24% соответственно; синтетические пептиды также вызывали Ca^{2+} -независимое ингибирование активности кальцинейрина в присутствии кальмодулина на 35, 48, 37, 19% для СП₁, СП₂, СП₃ и СП₄ соответственно. На основании полученных результатов можно предположить, что ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ являясь, по-видимому, аллостерическими регуляторами кальмодулина, связываются с ним и образуют комплекс кальмодулин—пептид, который, в свою очередь связываясь с СЕ А, содержащей кальмодулинсвязывающий домен, вызывает определенные конформационные изменения в молекуле кальцинейрина, ведущие к ингибированию его активности. Обнаруженный нами факт ингибирования ак-

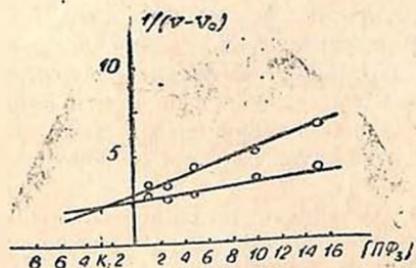


Рис. 2. Определение величин K_1 для кальцинейрина относительно коронароресуживающего пептидного фактора (ПФ), выделенного из гипоталамуса крупного рогатого скота. v —относительная флуоресценция при 445 нм; [ПФ₃]—иг ПФ₃ в пробе. 12,5 нМ кальцинейрина инкубировали с набором концентраций ПФ₃ (1—15 нг) в течение 10 мин при комнатной температуре, затем добавляли 0,7 мкМ или 1,4 мкМ 4-МУФ и инкубировали 1 ч при 32°

тивности кальцинейрина под влиянием вышеуказанных пептидных факторов как в присутствии Ca^{2+} и кальмодулина, так и в отсутствие Ca^{2+} (но в присутствии кальмодулина коррелирует с данными, полученными нами ранее с использованием метода ферментзависимого иммуносорбентного анализа (ELISA)), свидетельствует о том, что ПФ₁₋₅ связываются с кальмодулином как в присутствии, так и в отсутствие Ca^{2+} . Кальцинейрин оказался хорошей моделью для демонстрации этой особенности ПФ₁₋₅.

Как было сказано выше, учитывая, что СЕ В кальцинейрина имеет высокую степень гомологии (35%) [14] с кальмодулином, мы не исключали также возможности прямого воздействия ПФ₁₋₅ на фермент путем связывания с СЕ В, поскольку ПФ₁₋₅ обладают высоким сродством к кальмодулину ($K_d = 2-10$ нМ). Поэтому мы исследовали влияние ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ на активность фермента в отсутствие как Ca^{2+} , так и кальмодулина в инкубационной среде. В этом случае мы также наблюдали ингибирование активности фермента (рис. 1, а, 14—18; б, 12—15), однако оно было выражено

значительно слабее, чем в случае, когда инкубационная среда со-держала кальмодулин. Нативные коронаросуживающие пептиды ингибировали активность фермента на 8, 18, 25, 11, 18% для ПФ₁, ПФ₂, ПФ₃, ПФ₄ и ПФ₅ соответственно. Синтетические пептиды ингибировали активность кальцинейрина в этом случае на 7, 13, 20, 10% для СП₁, СП₂, СП₃ и СП₄ соответственно. На основании полученных результатов можно было предположить, что прямое воздействие ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ очевидно, имеет место, и, по-видимому, все же через связывание с СЕ В. Однако прямое воздействие ПФ₁₋₅ и СП₁₋₄ на фермент выражено лишь в незначительном ингибировании его активности, и, по всей вероятности, если предположить, что и в условиях *in vivo* ПФ₁₋₅ могут принять участие в регуляции активности кальцинейрина, то эти пептидные факторы будут оказывать воздействие на активность фермента путем связывания с кальмодулином.

Недавно пептид, названный LVV-геморфин-6, соответствующий фрагменту 32—40 β-цепи гемоглобина, был выделен из гипофиза человека [23]. Было обнаружено, что этот пептид обладает сильным опиоидным свойством, кроме того, является ингибитором ангиотензинконвертирующего фермента, то есть препятствует образованию сильного сосудосуживающего агента—ангиотензина II [24]. Эти данные косвенно подтверждают наши результаты, поскольку логично предположить, что данный пептид, содержащий аминокислотную последовательность ПФ₁₋₃ [6, 17], обладающих, как известно, и сосудосуживающими свойствами [3, 4], может конкурировать с ангиотензином II путем ингибирования активности ангиотензинконвертирующего фермента.

Таким образом, фрагмент 32—41 β-цепи гемоглобина содержит биологически активные пептиды и до сих пор имеются сообщения о выделении этих пептидов только из двух источников: гипоталамуса и гипофиза [3, 23]. Поскольку гипофиз и гипоталамус принадлежат к тем отделам мозга, где ГЭБ наиболее уязвим [25—27], можно предположить, что вышеуказанные биологически активные пептиды, образуясь из гемоглобина в результате его ограниченного протеолиза при различных физиологических или патологических состояниях организма, проникают в гипоталамус и гипофиз и принимают участие в различных метаболических процессах, в том числе и в регуляции активности Ca²⁺-кальмодулинзависимых систем, путем связывания с кальмодулином.

С помощью метода ELISA нами было обнаружено, что ПФ₁₋₅ изменяют чувствительность кальмодулина к ТФП [7, 8], а также к другим антагонистам кальмодулина [32]. Учитывая эти данные, мы исследовали кооперативное воздействие коронаросуживающих пептидов и ТФП на активность кальцинейрина. В экспериментах были использованы ПФ₃ и СП₃, которые в концентрации 10 нМ ингибировали активность кальцинейрина до уровня базальной. В свою очередь, ТФП в концентрации 50 мкМ также ингибировал актив-

ность кальцинейрина до уровня его базальной активности. Полученные результаты (таблица) показали, что при кооперативном воздействии ПФ₃ и ТФП, а также СП₃ и ТФП на активность кальцинейрина происходило уменьшение ингибиторного эффекта, вызываемого каждым из этих соединений в отдельности. По-видимому, в данном случае, в результате образования комплекса кальмодулин-пептид-ТФП происходят определенные изменения в конформации кальмодулина, отличные от тех, которые происходят при его связывании с пептидом или с ТФП. Комплекс кальмодулин-пептид-ТФП, в свою очередь, связываясь с СЕ А кальцинейрина, соответствующим образом изменяет и активность фермента.

Таблица

Кооперативное воздействие коронаросуживающих пептидных факторов (ПФ₃ и СП₃) и трифторперезина (ТФП) на активность кальцинейрина

Соединения	Относительная активность, %
Ca ²⁺	18
Кальмодулин + ЭГТА	19
Ca ²⁺ + кальмодулин	100
Ca ²⁺ + кальмодулин + ПФ ₃	21
Ca ²⁺ + кальмодулин + СП ₃	23
Ca ²⁺ + кальмодулин + ТФП	20
Ca ²⁺ + кальмодулин + ПФ ₃ + ТФП	41
Ca ²⁺ + кальмодулин + СП ₃ + ТФП	44

Примечание. Исследуемые соединения применялись в следующей концентрации: кальмодулин—360 нМ, CaCl₂—0,3 мМ, ЭГТА—1 мМ, кальцинейрин—12,5 нМ, ПФ₃—10 нМ, СП₃—10 нМ, ТФП—50 мкМ.

ТФП и пептид инкубировали 10 мин при комнатной температуре вместе с кальцинейрином, затем добавляли субстрат (1 мкМ 4-МУФ) и инкубировали 1 ч при 32°.

Как известно, многие антагонисты кальмодулина применяются в качестве лекарственных препаратов: фенотиазины (ТПФ и хлорпромазин) как антипсихотики [30], алкалоиды вибластины и винкристин при химиотерапии опухолей [31]. Эти препараты токсичны и оказывают побочные отрицательные эффекты на организм человека. Поэтому обнаруженный нами факт изменения чувствительности кальмодулина [7, 8], а также Ca²⁺-кальмодулинзависимого фермента—кальцинейрина к ТФП под влиянием коронаросуживающих пептидов (ПФ₃ и СП₃) может иметь и практическое значение при создании менее токсичных препаратов.

Мы предполагаем продолжить и углубить эти исследования с вовлечением более широкого спектра Ca²⁺, кальмодулинзависимых ферментов и более широкого набора антагонистов кальмодулина.

Авторы приносят благодарность д. х. и. Я. В. Возному, (Институт биохимии АН Армении) за предоставление 4-МУФ и 4-МУ и д-ру Ф. Лоттшайху (Институт биохимии им. Макс-Планка, Мюнхен, ФРГ) за предоставление синтетических пептидов.

THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF NATIVE AND
SYNTHETIC CORONAROCONSTRICTORY PEPTIDE FACTORS
ON Ca^{2+} , CALMODULIN-DEPENDENT
PHOSPHOPROTEIN PHOSPHATASE ACTIVITY

BARSEGHIAN K. S., BARKHUDARYAN N. A., GALOYAN A. A.

H. Ch. Buniatian Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

The influence of native and synthetic coronar-constrictory peptide factors (PF₁₋₃) on the Ca^{2+} , CaM-dependent phosphoprotein phosphatase (calcineurin) activity has been investigated. Phosphatase activity was assayed by spectrophotometric assay using 4-methylumbelliferyl phosphate (4-MUP).

It has been determined that as native as well as synthetic peptides are sensitive inhibitors for calcineurin with K_i 1,8–2,5·10⁻⁹ M for native peptides and K_i 2,2–3,1·10⁻⁹ M for synthetic ones.

During the investigation of cooperative influence of coronary constrictory peptides and TFP on calcineurin activity it has been discovered that the inhibitory effect of these compounds on calcineurin activity decreases. The possibility for PF₁₋₃ participation in the regulation of calcineurin activity *in vivo* is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Cohen P. Ann. Rev. Biochem., v. 58, p. 453–508, 1969.
2. Cohen P. Proc. R. Soc. London, Ser. B., v. 234, p. 115–141, 1969.
3. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519–524, 1988.
4. Бархударян Н. А., Закарян Т. Р., Шувалова Л. А., Чацлян С. Г., Александриян А. Р., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 8, № 4, с. 485–491, 1989.
5. Barkhudaryan N., Zakaryan T., Aleksanyan A., Sharova N., Shuvailova L., Chacilyan S., Galoyan A. 8th ESN Meeting, Leipzig, p. 21, 1990.
6. Закарян Т. Р., Бархударян Н. А., Шувалова Л. А., Остроянская М. В., Шарова Н. П., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 9, № 4, с. 444–449, 1990.
7. Nugra'h L., Barkhudaryan N., Galoyan A., Ovadi J. FEBS Lett., v. 276, № 1, 2, p. 197–200, 1990.
8. Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А. А., Овади Ю. Нейрохимия, т. 9, № 2, с. 190–197, 1990.
9. Martin B. L., Graves D. J.—In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 4, p. 95–125, Leuven University Press, Leuven, 1987.
10. Klee C. B., Crouch T. H., Krinks M. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 76, p. 6270–6273, 1979.
11. Gur'ia R. C., Khandevan' R. L., Sulakhe P. V. FEBS Lett., v. 190, p. 104–108, 1985.
12. Klee C. B., Krinks M. H., Manalan A. S., Draetta G. F., Newton D. L.—In: Advances in Protein Phosphatases (eds. W. Merlevede, J. Di Salvo), v. 1, p. 135–146, 1985.
13. Aitken A., Klee C. B., Cohen P. Eur. J. Biochem., v. 139, p. 663–671, 1984.
14. Aitken A., Cohen P., Santikarn S., Williams D. H., Calder A. G., Klee C. B. FEBS Lett., v. 150, p. 314–318, 1982.

15. *Kretsinger R. H.* CRC, Crit. Rev. Biochem., v. 3, p. 119—174, 1986.
16. *Hubbard S. R., Hodgson K. O., Dontach S.* J. Biol. Chem., v. 263, p. 4151—4158, 1988.
17. *Бархударян Н. А., Келлерман Я., Лоттшпайх Ф., Галоян А. А.* Нейрохимия, т. 10, № 3—4, с. 146—154, 1991.
18. *Sharma R. K., Desai R., Waisman D. M., Wang J. H.* J. Biol. Chem., v. 254, p. 4276—4282, 1979.
19. *Taliani E. A., Wallace R. W., Cheung W. Y.* Methods Enzymol., v. 102, p. 241—256, 1983.
20. *Laemmli U. K.* Nature, v. 227, p. 680—685, 1970.
21. *Anthony F. A., Mera D. L., Cheung W. Y.* Anal. Biochem., v. 155, p. 103—107, 1986.
22. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
23. *Glümsa E.-L., Marklund A., Hellman U., Wernstedt C., Terenius L., Nyberg F.* Reg. Peptides, v. 34, p. 169—179, 1991.
24. *Lantz I., Glümsa E.-L., Täck L., Nyberg F.* FEBS Lett., v. 287, № 1, 2, p. 39—41, 1991.
25. *Bouchaud C., Bosler O.* Int. Rev. Cytol., v. 105, p. 233—277, 1986.
26. *Leonhardt H.*—In: Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen (ed. Oksche A.), p. 177—666, Springer-Verlag, 1980.
27. *Risau W., Wolburg H.* TINS, v. 13, p. 174—178, 1990.
28. *Klee C. B., Cohen P.*—In: Molecular Aspects of Cellular Regulation (ed P. Cohen), p. 225—248, Elsevier, Amsterdam, N. Y., Oxford, 1988.
29. *Klee C. B., Krinks M. H.* Biochemistry, v. 17, p. 120—126, 1978.
30. *Reid R. E., Gariery J., Hodges R. S.* FEBS Lett., v. 154, p. 60—64, 1983.
31. *Vilson L.* Life Sci., v. 17, p. 303—310, 1975.
32. *Бархударян Н. А., Барсегян К. С., Аветисян Н. А., Закарян Т. Р., Галоян А. А.* Нейрохимия, т. 11 № 2, с. 228—234, 1992:

Поступила 15. 11. 1992

ВЛИЯНИЕ ВАНАДАТА НА СКОРОСТЬ ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЯ ФОСФОЭФИРОВ В РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛАХ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

ПАРСАДАНЯН Г. К., АДМУЦ Г. Т., АДМУЦ Г. Г., ТЕР-ТАТЕВОСЯН Л. П.
Институт биохимии НАН Армении, Ереван

Ванадий относится к необходимым микроэлементам с малоизученной биологической функцией. В наших экспериментах обнаружено значительное понижение активности щелочной и кислой фосфатаз в нервной ткани (*in vitro*), зависящее от концентрации ванадата (10^{-7} — 10^{-5} М). Более того, наблюдалось явное снижение чувствительности этих ферментов к VO_2^- при переходе от высших и относительно молодых отделов ЦС (полушария, мозжечок, продолговатый мозг) к древним. Активность фосфопротенифосфатазы также ингибировалась в различных структурах ткани мозга, однако в спинном мозгу низкие концентрации ванадата (10^{-5} М) вызвали определенное повышение активности фермента. Лишь при повышении концентрации до 10^{-3} М ванадат оказывал умеренно ингибирующий эффект. Обсуждается возможность существования в ЦС филогенетически разных форм фосфопротенифосфатазы, отличающихся по их чувствительности к ванадату.

К настоящему времени установлено значительное распространение ванадия во внешней среде, высокое содержание его соединений в отходах и продуктах производственной деятельности современной цивилизации.

Соединения ванадия могут поступать в организм через дыхательный и пищеварительный тракты, а также через кожу. Оставшийся в организме ванадий откладывается в печени и костях. Ванадий способен проникать через ГЭБ. По данным многовариантного анализа, существует явная корреляция между соединениями ванадия в воздухе и общим уровнем смертности людей [1]. Интимный механизм взаимодействия между ванадием и ферментами пока остается открытым. Слабая изученность последствий, вызываемых воздействием производственных соединений ванадия на те или иные звенья метаболизма, послужила основанием для рассмотрения действия различных концентраций ванадата на активность некоторых ферментов, функция которых связана с переносом или отщеплением фосфатных группировок: фосфопротенифосфатазы (ФПФаза, К.Ф. 3.1.3.16), щелочной (ЩФаза) и кислой (КФаза) фосфатаз (КФ 3.1.3.1 и 3.1.3.2—соответственно).

Материалы и методы

В опытах использован головной и спинной мозг беспородных кроликов-самцов массой 1,8—2,2 кг.

Активность ФПФазы выявлялась в гомогенатах тканей (1:5 в/об) методом, основанным на определении отщепленного ферментом фосфора фосфопротеинов без их предварительного протеолиза [2], и выражалась в Е (нМ Р/мин на г ткани).

Для определения активности ЩФазы использовали 2 мМ раствор *n*-нитрофенилфосфата Na («Serva», ФРГ). Об активности фермента судили по количеству отщепившегося при pH 9,6 *n*-нитрофенола [3], с некоторыми модификациями: вместо аммиачной буферной смеси при определении ЩФазы использовали 20 мМ мединаловый буфер. Активность КФазы определяли в тех же условиях, но при pH 4,6.

Результаты исследования

Информация относительно возможной регуляции процессов фосфорилирования-дефосфорилирования внутриклеточных ФП ванадатом ограничена, главным образом, данными о воздействии на некоторые протеникиназы, о ФПФазах же сведения крайне отрывочны и противоречивы [4—7]. Так, в зависимости от источника фермента, условий среды инкубирования и концентрации используемых соединений ванадия, в опытах *in vitro* был обнаружен как его активирующий эффект на ФПФазу [8], так и ингибирующий [5, 7]. Исходя из этого, представляло интерес выявить особенности пострецепторного действия ванадата на ФПФазу в различных отделах головного и спинного мозга. Результаты опытов, в которых об активности ФПФазы судили по скорости отщепления неорганического фосфата от сериновых и треониновых остатков молекулы казеина, приведены в табл. 1.

ФПФазная активность максимальна в больших полушариях мозга (152 Е), достаточно высока в продолговатом мозгу и мозжечке (104 и 95 Е, соответственно) и последовательно снижается при переходе от верхних отделов спинного мозга к нижним. В поясничном отделе она в 2,5 раза ниже, чем в больших полушариях. Однако различия эти не ограничиваются чисто количественными параметрами (табл. 1). При использовании широкого диапазона концентраций эффектора ванадата аммония (от 10^{-9} до 10^{-3} М) выяснилось, что в наиболее «молодых» структурах (больших полушариях и продолговатом мозгу) фосфатазная активность относительно к казеину достаточно резистентна к присутствию ванадата в малых и средних концентрациях (10^{-9} — 10^{-5} М) и умеренно ингибируется (на 40—50%) миллимолярными его концентрациями. При анализе уровня активности в более «древних» образованиях головного мозга, и особенно в отделах спинного мозга, выяснилось, что ФПФаза моз-

Таблица 1

Влияние ванадата на активность фосфопротенинфосфатазы в отделах
головного и спинного мозга (нмоль Р_n / г ткани/мин) (n=6)

Концентрации M ^{II}	Норма	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³
Отделы								
Большие полушария	152±14	114,4±1,0	113,7±14,0	126±6	132±9	108±5	88±5	74±6
Мозжечок	95±8	97±9	98,8±10,0	102,6±9,0	105±10	119±16	86±8	49±4
Продолговатый мозг	104±10	99,8±9,0	97,7±7,0	83±11	78±6	74,8±5,0	75,9±5,0	62,4±4,0
Шейный отдел	79±6	105±6	106±8	127±10	116±7	85,3±8,0	63,9±5,0	31,6±4,0
Грудной отдел	83±6	85±6	86±7	103±7	103±5	95±6	81±1	51±4
Поясничный отдел	60±7	90±6	108±8	121±8	125±9	89±8	68±6	51±6

жечка активируется примерно на 30% 10^{-5} М ванадатом, хотя более высокие концентрации этого лиганда (10^{-3} М) почти вдвое понижают ферментативную активность. Максимальный положительный эффект обнаружен нами в отношении ФПФазы поясничного отдела спинного мозга, где активность фермента повышалась более чем вдвое в присутствии весьма низких концентраций ванадата (10^{-7} — 10^{-6} М). Некоторое активирование ФПФазы ванадатом (10^{-7} — 10^{-5} М) наблюдалось и в гомогенатах шейного и грудного отделов спинного мозга (на 25—30%), хотя и при увеличении содержания ванадата в среде до 10^{-3} М активность фермента подавлялась соответственно на 60 и 35%. Активирование ванадатом обнаружено и в отношении высокомолекулярной ФПФазы из печени крыс [8]. В этом случае авторами было обнаружено 50%-ное активирование 10^{-5} М ванадатом. При более высоких его концентрациях (10^{-4} — 10^{-3} М) этот эффект несколько ослабевал. Моуек [9] установлен факт активирования ванадатом (10^{-5} — 10^{-10} М) другой фосфатазы— Na^+ , K^+ -стимулируемой АТФазы в коре, подкорковых структурах и *Medulla oblongata* у молодых крыс. У взрослых же животных или при более высоких концентрациях ванадата проявлялся ингибирующий эффект.

Полученные нами результаты позволили дать ответ на некоторые принципиальные вопросы. Не исключая возможности действия ванадата путем активирования тирозинкиназной активности инсулинового рецептора [4] и другие дистанционные механизмы управления внутриклеточными процессами, мы обнаружили факт прямой *in vitro* регуляции ванадатом активности ФПФазы в нервных клетках, причем характер его воздействия в значительной мере определялся особенностями метаболизма и функций отдельных участков ЦНС. По мере перехода от филогенетически древних образований к более молодым отмечалось исчезновение активирующего эффекта наномолярных концентраций ванадата и превалирование неспецифического ингибирования ФПФазы высокими дозами этого препарата.

Что касается данных литературы о результатах взаимодействия ванадата с фосфатазами, гидролизующими низкомолекулярные фосфорные эфиры, бросается в глаза их противоречивость и разрозненность [5,9—11].

По нашим данным, в различных структурах головного мозга активность щелочной фосфатазы в норме оказалась значительно выше, чем в изученных отделах спинного мозга (табл. 2). В шейном и грудных отделах активность этого фермента не превышала 30—40% от фосфатазной активности больших полушарий.

Как видно из табл. 2, наибольшей чувствительностью к ванадату отличалась щелочная фосфатаза полушарий. В концентрации 10^{-3} М ванадат примерно в 15 раз подавлял ее активность. В различных структурах спинного мозга активность щелочной фосфатазы ингибировалась в 6—9 раз в присутствии 10^{-3} М ванадата в среде. Несколько большую резистентность щелочной фосфатазы грудного и поясничного отделов спинного мозга по сравнению с ферментом

из коры полушарий установили в присутствии низких концентраций ванадата (10^{-6} M).

Согласно полученным нами данным (табл. 3), сходное воздействие оказывал ванадат на активность кислой фосфатазы в указанных выше отделах НС. Ранее было показано ингибирующее действие ванадата на активность КФазы из других тканей крыс [12].

Таблица 2
Влияние ванадата на активность щелочной фосфатазы в различных отделах головного и спинного мозга (имоль *л*-нитрофенола/г ткани/мин) (n=6)

Контент ванадата (М)	Норма	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Большие полушария	255±15	257±18	237±22	164±10	74±4	19±3
Мозжечок	280±7	233±7	216±20	145±9	75±5	31±4
Продолговатый мозг	276±18	252±20	250±21	165±12	72±8	31±4
Шейный отдел	127±11	114±10	120±8	66±6	16,5±3	13,0±2,5
Грудной отдел	85±10	81±11	73±10	52±4	36±4	14±3
Поясничный отдел	168±19	161±18	161±8	86±6	36±3	20±2

Таблица 3
Влияние ванадата на активность кислой фосфатазы в различных отделах головного и спинного мозга (имоль *л*-нитрофенола/г ткани/мин) (n=6)

Контент ванадата (М)	Норма	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Большие полушария	1639±60	1410±53	950±45	491±21	350±20	262±19
Мозжечок	1187±47	1512±40	1167±37	677±23	395±21	305±12
Продолговатый мозг	946±33	880±32	823±30	533±26	344±14	335±14
Шейный отдел	597±31	519±29	416±28	395±28	387±14	288±20
Грудной отдел	489±27	489±31	402±16	291±20	230±8	218±16
Поясничный отдел	631±31	630±33	540±33	487±19	374±22	310±11

Обсуждение результатов

Одной из причин возрастающего в последнее время интереса к биохимии ванадия является возможная регуляция им углеводно-фосфорного обмена. Среди путей регуляции ванадатом обменных процессов посредством фосфорилирования тирозиновых остатков белков часто упоминается инсулинподобный механизм его действия на уровне изолированных клеток, тканей, очищенных инсулиновых рецепторов [13, 14], а также на диабетических крысах [15]. Поскольку химия соединений ванадия является весьма сложной [16], непросто сопоставить результаты непосредственного действия ванадата на компоненты клетки и данные о его воздействии на целостный организм. Биологические механизмы, которыми осуществляется его участие в регуляции углеводного обмена недостаточно ясны. Получены противоречивые данные о влиянии ванадата на активность различных фосфатаз, аденилатциклазы, фосфофруктокиназы, глюко-

киназы и др. [6]. Большой интерес представляет вероятная регуляция им деятельности протеникиназ и ФПФаз, контролирующих углеводный обмен. При оральном введении метаванадат нормализовал содержание глюкозы крови и стимулировал, подобно инсулину, липогенез в жировой ткани у крыс, страдающих стрептозотоциновым диабетом [17]. В целом, как и под действием ФПФаз, в присутствии ванадата наблюдался сдвиг в метаболических процессах от кататаболизма к анаболлизму. В опытах на интактных клетках обнаружено, что этот эффектор повышает активность гликогенкиназы в адипоцитах [18]. Подобно инсулину, ванадат противодействовал активирующему действию адреналина на гликогенфосфоорилазу. Имеются убедительные доказательства в пользу того, что ванадат способен напрямую активировать тирозинкиназную активность инсулинового рецептора [4]. Скорее всего, причина этого заключается в том, что подобные реакции протекают с образованием промежуточных соединений, в которых присутствует пятиявалентный фосфор [19].

В наших экспериментах ФПФазная активность различных отделов ЦНС крыс слабо (поясничной, грудной отделы спинного мозга) или умеренно (большие полушария, мозжечок) ингибировались ванадатом в концентрации 10^{-3} М. В то же время, в пределах 10^{-6} — 10^{-5} М концентраций этого эффектора ФПФазная активность в поясничном и шейном отделах спинного мозга значительно (в 1,5—2 раза) возрастала, тогда как в больших полушариях и продолговатом мозгу несколько понижалась. Поскольку ранее Парсаданияном и соавт. [20] было установлено наличие множественных форм ФПФаз в нервной ткани, можно предположить, что полученный нами эффект является суммарным, и в нервной ткани наряду со слабо ингибируемыми сериновыми фосфатазами имеются и более выражено ингибируемые тирозиновые ФПФазы, причем удельное содержание последних нарастает по мере приближения к наиболее сложным и филогенетически молодым формированиям головного мозга. По-видимому, сериновые фосфатазы широкого профиля действия сформировались на более ранних этапах возникновения и развития много- и даже одноклеточных организмов, тогда как более селективные тирозиновые ФПФазы, предназначенные для регуляции узкого круга фосфорилированных по тирозину белков, возникли на более поздних этапах филогенеза. В предварительных опытах, проведенных в лаборатории Р. Сонеп (Университет Dandy, Великобритания) на очищенных препаратах ФПФаз 1 и 2А Г. К. Парсаданияном было показано, что они резко отличаются чувствительностью к ванадату (неопубликованные данные).

Примечательен феномен активирования некоторых ФПФаз низкими концентрациями ванадата (табл. 1). Можно предположить, что в этих концентрациях ванадат взаимодействует с высокоаффинным аллостерическим участком молекулы фермента, тогда как в более высоких концентрациях лиганда преимущественно проявляется не-

специфическое конкурентное взаимодействие по учетку связывания молекулы фосфоэфира. В литературе также имеются единичные данные о том, что некоторые фосфатазы [9], в том числе и ФПФазы [8], активируются микро- и наномолярными количествами ванадата. В дальнейшем нами предполагается изучить кинетику взаимодействия ванадата с отдельными молекулярными формами ФПФаз.

THE EFFECT OF VANADATE ON THE VELOCITY OF DEPHOSPHORYLATION OF PHOSPHOETHERS IN DIFFERENT PARTS OF NERVOUS SYSTEM

PARSADANIAN H. K., ADUNTS G. T., ADUNTS G. G., TER-TAIEVOSIAN L. P.

II. Ch. Bunlation Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

Vanadium is one of the necessary microelements with less studied biological function. In our experiments it is discovered a noticeable decrease of alkaline and acid phosphatase activity in nerve tissue (in vitro), depending on the concentration of vanadate (10^{-7} – 10^{-3} M). Moreover, it was noted the obvious decrease of the sensibility of these enzymes to VO_3^- at passing from the highest and relatively young parts of NS (hemispheres, cerebellum, medulla oblongata) to archaic ones. Phosphoprotein phosphatase (PhPPase) activity was also inhibited in different structures of brain tissue, but in spinal cord the low concentrations of vanadate (10^{-5} M) caused a certain increase of the enzyme activity. Only at the increase of the concentration to 10^{-3} M vanadate made a moderate inhibiting effect. It is discussed the possibility of the existence of phylogenetically various forms of phosphoprotein phosphatase in NS differing by the sensibility to vanadate.

ЛИТЕРАТУРА

1. Vanadium Env. Hith. Grifcala 81, World Hith Org., Geneva 1988.
2. Feinstein R. N., Folk M. E., J. Biol. Chem., v. 177, p. 339–344, 1949.
3. Шлыгин Г. К., Михлин С. Я. Вопр. мед. химии, № 6, с. 461–468, 1955.
4. Gresser M. J., Tracey A. S., Stankeiwicz P. J. Adv. Prot. Phosphatases, v. 4, p. 75–57, 1987.
5. Lau K.-H. W., Farley J. R., Baylink D. L. Adv. Prot. Phosphatases, v. 4, p. 165–198, 1987.
6. Bosch F., Gomez-Foix A.-M., Arino J. Adv. Prot. Phosphatases, v. 4, p. 351–362, 1987.
7. Tapley P., Rohrshneider L. Adv. Prot. Phosphatases, v. 5, p. 261–278, 1989.
8. Khandelwal R. L., Enno T. L. Adv. Prot. Phosphatases, v. 3, p. 107–120, 1986.
9. Mourek J. Physiol. Bohemoslov., v. 36, № 4, 341–345, 1987.
10. Missiaen I., Vrolix M., Rzymackers L., Casteelse R. Adv. Prot. Phosphatases, v. 5, p. 239–260, 1989.
11. Curii C., Pizzaro I. M., Ciancaglini P., Leone F. A. Сеп. Mol. Biol., v. 33, № 5, p. 625–635, 1987.
12. Адуц Г. Т., Парсадян Г. К., Адуц Г. Г. ДАН АрмССР, т. 88, № 1, с. 35–38, 1989.

13. *Kiarlund J. K.* Cell., v. 41, p. 707-717, 1985.
14. *Tamura S., Brown T. A., Whipple J. N., Fujita-Iamaguchi I., Dubler R., Cheng K., Larner J. J.* Biol. Chem., v. 259, p. 6650-6658, 1984.
15. *Heytiger C. F., Tahiliani A. G., Newcill J. H.* Science, v. 227, p. 1471-1477, 1985.
16. *Nechay B. R., Ninira L. B., Neclay S. E., Post F. L., Grantham J. J.* Fed. Proc., v. 42, p. 123-132, 1983.
17. *Meyerovitch J., Farfel Z., Saeh J., Shechter I. J.* Biol. Chem., v. 262, № 14, p. 6658-6662, 1987.
18. *Tamura S., Brown T. A., Dubler R. E., Larner J.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 113, p. 80-85, 1983.
19. *Chasteen N. D.* Struct. Bonding (Berlin), v. 53, p. 105-137, 1983.
20. *Парсадилян Г. К., Бунтян Г. К.* ДАН СССР, т. 257, № 5, с. 1258-1261, 1981.

11

Поступила 23. VIII. 1991

УДК 577.152

ИЗОЛИРОВАНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ ФОРМ АМР-ДЕЗАМИНАЗЫ
ИЗ НЕРВНОЙ ТКАНИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

ШАРОЯН С. Г., МАРДАНЯН С. С., АРУТЮНЯН А. В.

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

Разработан метод выделения АМР-дезаминаз из различных отделов мозга: серого вещества и впервые из аденогипофиза крупного рогатого скота. Для градиентной элюции фермента с аффинного сорбента фосфоцеллюлозы РП применен широкий диапазон концентраций КСI (0,2—2,0 М). Разработан чувствительный метод определения ферментативной активности по флуоресценции комплекса о-фталальдегида (ОФА) с продуктом реакции аммиаком. Используемые методы позволили показать, что в изученных отделах мозга АМР-дезаминаза представлена в шести молекулярных формах. Проведено также сравнительное исследование некоторых кинетических свойств количественно наиболее доступных форм фермента.

АМР-дезаминаза (КФ 3.5.4.6 АМР-аминогидролиза) в различных животных тканях представлена несколькими молекулярными формами. Ogasawara и соавт. посвятили ряд работ исследованию спектра этих форм ферментов в различных тканях животных [1, 2] и человека [3, 4]. Оказалось, что скелетная мышца, почки и сердце содержат по одной тканеспецифичной форме фермента, а мозг, печень, поджелудочная железа, селезенка, легкие характеризуются присутствием в них нескольких молекулярных форм фермента. Позднее Raggi и соавт. [5] показали существование в мышцах (в зависимости от гистологического типа) двух различных изоформ АМР-дезаминазы. Ogasawara и соавт. [6] и Арутюнян, Ловенштейн [7] исследовали изоферментный состав АМР-дезаминазы мозга животных. Было показано присутствие в мозгу крыс 5-и молекулярных форм фермента, представляющих собой продукт гибридизации в различных соотношениях его двух форм, характерных для сердца (С-форма) и почек (В-форма). Из головного мозга крупного рогатого скота до настоящего времени фермент был выделен лишь в виде одной молекулярной формы [8, 9].

Для получения более обстоятельной информации о природе АМР-дезаминазы нами были предприняты исследования по изучению фермента из различных отделов мозговой ткани крупного рогатого скота. Полученные результаты свидетельствуют о существовании шести молекулярных форм АМР-дезаминазы в гипофизе и сером

веществе мозга, что представляет существенный интерес в развитии представлений об органичной локальной специфичности изученного фермента, выражающейся, в частности, в наличии его молекулярных разновидностей.

Материалы и методы

Определение ферментативной активности АМР-дезаминазы производили в 0,8 мл инкубационной смеси следующего состава: 100 мкл раствора фермента, содержащего примерно 40 мкг белка, 2 мМ АМР, 2 мМ АДР или АТР, 40 мМ имидазол-НСI буфер, рН 7,0. Смесь инкубировали при 37° 10 мин, реакцию останавливали добавлением 0,5 мл этанола. Количество образовавшегося аммиака определяли согласно методикам, указанным в литературе [10—12] с некоторой модификацией. Метод основан на флуоресцировании комплекса ОФА-NH₄ при нейтральных рН в присутствии 2-меркаптоэтанола при $\lambda_{\text{возб.}}$ = 413 нм и $\lambda_{\text{эм.}}$ = 485 нм. Наличие в растворе аминокислот, пептидов и белков не мешает определению аммиака, ибо флуоресценция комплексов ОФА с перечисленными первичными аминами проявляется при значениях рН выше 9,0 и при других параметрах флуоресценции. Для определения аммиака к каждой пробе добавляли по 0,2 мл 0,1-процентного раствора ОФА в 0,1 М К-фосфатном буфере, рН 7,0, содержащем 1,5 мМ 2-меркаптоэтанола. Пробы выдерживали в темноте в течение 1—2 ч. В случаях выпадения белкового осадка его удаляли центрифугированием и измеряли флуоресценцию прозрачного раствора. Содержание контрольных проб было идентично опытным, добавление же этанола производили до начала инкубации. Активность фермента выражали либо в условных единицах флуоресценции, либо же в мкмоль аммиака, образующегося в течение 1 мин. Для этих расчетов была построена калибровочная кривая зависимости относительной флуоресценции комплексов ОФА-NH₄ от концентрации аммиака. В качестве стандарта использовали хлорид аммония. Величину У.А. фермента выражали в мкмоль аммиака/мин/мг белка.

Содержание белка определяли по методу Bradford [13].

Использовали фосфоцеллюлозу РII («Whatman», Англия), ОФА, АМР и GTP («Serva», ФРГ), 2-меркаптоэтанол, АДР и АТР («Sigma», США), а также другие реактивы (х.ч. и ч.д.а.) отечественного производства.

Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре SPECORD UV VIS (ГДР), флуорометрические измерения проводили при комнатной температуре на спектрофлуорометре MPF-44A («Perkin-Elmer», США) в квадратных кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Результаты и обсуждение

АМР-дезаминазу из исследованных тканей выделяли идентичным путем, используя обычно применяемые методы очистки фермента [9].

14]. 200 г очищенной от пленок ткани измельчали скальпелем и гомогенизировали в 5-кратном объеме 20 мМ К-фосфатного буфера (А), рН 7,0, в гомогенизаторе РТ-1 при скорости 8000 об/мин в течение 2 мин. Гомогенат центрифугировали при 6000 g на протяжении 1 ч и фильтровали через два слоя марли. К супернатанту добавляли КСl до конечной концентрации 50 мМ и вносили фосфоцеллюлозу, уравновешенную буфером А, содержащим 50 мМ КСl. Смесь размешивали на магнитной мешалке в течение 1 ч и после отстойки надосадочную жидкость сливали. Фосфоцеллюлозу с ад-

Характеристики молекулярных форм АМР-дезаминида из аденогипофиза и серого вещества мозга крупного рогатого скота

Фракция	Концентрация КСl при которой элюируется данная фракция (М)	K _{0.5} в реакциях д-аминирования АМР (мМ)	
		аденогипофиз	серое вещество мозга
I	0,4—0,6	3,0	2,0
II	0,7—0,8	8,0	3,0
III	0,95—1,05	4,0	4,5
IV	1,25—1,27	7,5	6,0
V	1,4—1,5	9,0	—
VI	1,7—1,8	12	—

сорбированными белками промывали тем же буфером и переносили в колонку (×10 см), которую промывали 250-миллилитровым порциями буфера А, содержавшего соответственно 0,1 и 0,2 М КСl. Затем применяли градиентную элюцию, используя градиент КСl в буфере А от 0,2 до 2,0 М. На рис. 1 представлены полученные при этом элюционные диаграммы по белку и по АМР-дезаминирующей активности. Как видно из рисунка, ферментативная активность из обоих источников элюируется в 6-и пиках, и, хотя общий вид профиля элюции по белку и по активности несколько отличается для двух использованных тканей, все 6 изоферментов элюируются примерно при одинаковых концентрациях КСl, приведенных в таблице. Для дальнейшей очистки изоферментов каждую фракцию разбавляли водой в 2—3 раза и снова наносили на колонку с фосфоцеллюлозой, уравновешенной буфером А и содержащей соответствующую концентрацию КСl. После этого белок элюировали буфером А, содержащим 1,5 М КСl для I—III фракций и 2,0 М КСl для IV—VI фракций. Полученные таким образом препараты фермента использовали для кинетических исследований. На рис. 2 представлена типичная зависимость скорости реакции деаминирования АМР от концентрации субстрата без регуляторов и в присутствии ADP и АТФ для изоферментов II из аденогипофиза (А) и из серого вещества мозга (Б). В таблице приведены значения кажущихся ве-

личин K_m для изоферментов из обеих тканей. Примечательно, что в отсутствие активаторов кривая имеет явно выраженную сигмоидальную форму, а при наличии в реакционной среде АТФ или АДФ зависимость скорости реакции от концентрации субстрата становится гиперболической, причем АТФ является более эффективным активатором, чем АДФ. Аналогичные кривые получены для всех изоферментов из обеих тканей. Для оценки числа субстратсвязывающих

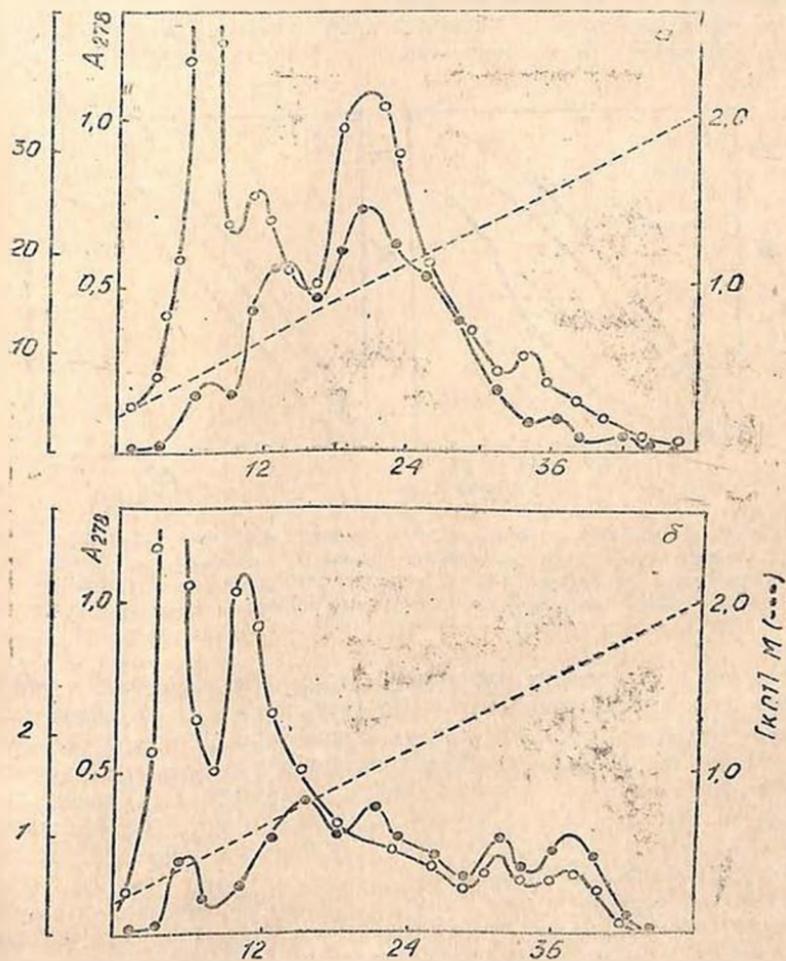


Рис. 1. Хроматография растворимой фракции экстракта аденогипофиза (а) и серого вещества мозга (б) с фосфоцеллюлозной колонки: АМР-дезаминная активность (●—●), поглощение при 278 нм (○—○). Градиент KCl (---) осуществляли между концентрациями 0,2 и 2,0 М объемами по 250 мл. Фракции собирали по 10 мл. По оси абсцисс—номера элюируемых фракций, по оси ординат—активность фракций (мкмоль NH_4 /мин)

центров выделенных изоферментов нами были определены величины n_{ii} , соответствующие наклону прямой зависимости $\lg \frac{v}{V-v}$ от $\lg [S]$. В отсутствие регуляторов и при среднем насыщении фермента субстратом величины n_{ii} для всех фракций оказываются в пределах значений от 3 до 4, ожидаемых для тетрамерных ферментов. В присутствии АТР эти величины принимают значения 1—1,5, что соответствует снятию кооперативности взаимодействия фермента с субстратом и переходу от сигмоидальной зависимости между активностью фермента и концентрацией субстрата к гиперболической (рис. 2).

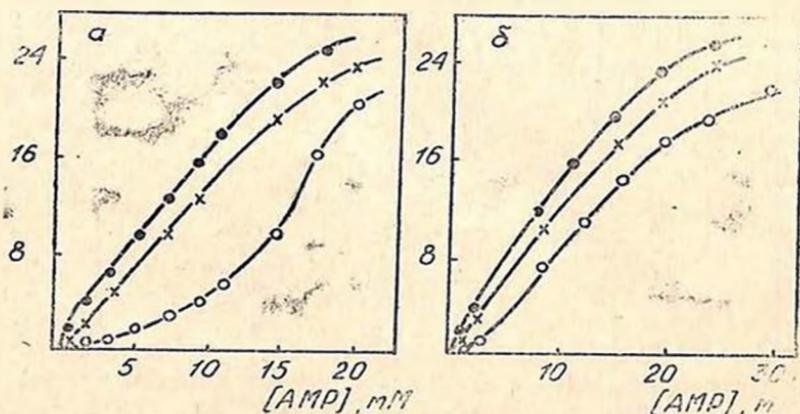


Рис. 2. Зависимость скорости дезаминирования АМР изофермента II аденогипофиза (а) и серого вещества мозга (б) от концентрации АМР в отсутствие регуляторов (○ ○), в присутствии 1,5 мМ АТР (⊕ ⊕), в присутствии 1,5 мМ АДР (* *). По оси абсцисс—концентрация АМР (мМ), по оси ординат—активность фермента (мкмоль $\text{NH}_4/\text{мин}$).

На рис. 3 приведены характерные для всех изученных фракций кривые зависимости ферментативной активности для изофермента II из аденогипофиза от концентрации активатора АТР и ингибитора ГТР. Для этой фракции константа активации, определенная по методу двойных обратных величин, оказалась равной 0,125 ммоль. Величина K_i для ГТР, определенная по методу Dixon [15], равнялась 0,3 ммоль. Эти значения находятся в пределах величины, обычно наблюдаемых для АМР-дезаминаз.

Известно, что ионы одновалентных металлов являются активаторами АМР-дезаминаз из различных источников [16, 17], что подтверждается и в отношении исследованных нами ферментов из мозговой ткани под влиянием ионов калия. На рис. 4 показаны зависимости активности фракций II, полученных из аденогипофиза и серого вещества мозга, от концентрации КСl. В обоих случаях отмечается совпадение оптимумов концентрации ионов в пределах примерно 0,1 М, тогда как при более высоких концентрациях прояв-

ляется ингибирующее влияние на активность фермента. Эта закономерность прослеживалась во всех изученных случаях.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о наличии шести молекулярных форм АМР-дезаминазы в двух изученных отделах мозговой ткани крупного рогатого скота. Фермент впервые был выделен из аденогипофиза и разделен на молекулярные формы.

Следует заметить, что АМР-дезаминаза из головного мозга крупного рогатого скота была ранее выделена и описана американскими учеными как одна молекулярная форма [8, 9], что создало определенное противоречие с данными других исследователей [6, 7], от-

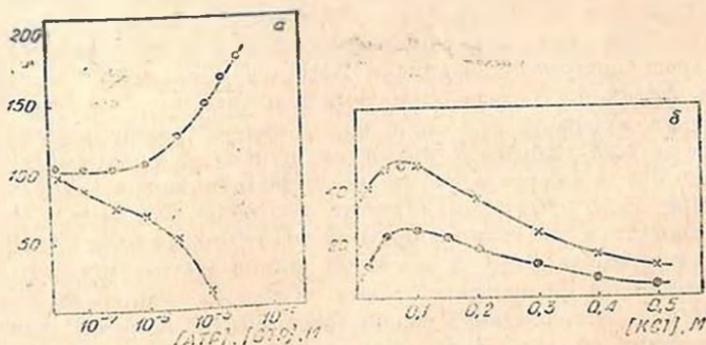


Рис. 3. а—АМР-дезаминазная активность изофермента II из аденогипофиза в зависимости от концентрации АТР (⊙—⊙) и ГТР (х—х) при концентрации субстрата 2 мМ. По оси абсцисс—концентрации АТР и ГТР (в М), по оси ординат—активность в %.

б. АМР-дезаминазная активность изофермента II из аденогипофиза (⊙—⊙) и серого вещества мозга (х—х) в зависимости от концентрации КСl. По оси абсцисс—концентрация КСl (в М), по оси ординат—активность в относительных единицах.

мечавших наличие в цельном мозгу крыс пяти изоферментов. Факт обнаружения нами в мозговой ткани шести молекулярных форм АМР-дезаминазы можно объяснить, с одной стороны, применением более широкого диапазона концентраций КСl, использованных для элюции ферментативной активности в диапазоне 0,2—2,0 М. В работах Sellow, Lowenstein [8] и Rhoads [9] при исследовании фермента из мозга крупного рогатого скота использовали градиент КСl 0,1—1 М. Ogasawara и соавт. при исследовании фермента из мозга крыс не использовали градиент КСl 0,1—1,2 М [6]. Как видно из рис. 1 и таблицы, большинство молекулярных форм АМР-дезаминазы элюируется с фосфоцеллюлозы при концентрациях выше 1 М, что свидетельствует о том, что ограниченный диапазон концентраций при градиентной элюции являлся основной причиной обнаружения лишь одной молекулярной формы АМР-дезаминазы из головного мозга крупного рогатого скота. Обнаружение большего числа молекулярных форм фермента стало возможным благодаря

тому, что для определения его активности нами впервые был применен чувствительный флуорометрический метод—определения аммиака с помощью ОФА, позволяющий выявить с максимальной точностью наномолярные концентрации аммиака в исследуемом растворе в присутствии других аминоксодержащих соединений. Спектрофотометрический и колориметрический (с использованием реактива Неселера) методы, использованные ранее в работах Setlow [8], Rhoads и соавт. [9] не отличались столь высокой степенью точности.

Следует отметить, что профиль, полученный нами при градиентной элюции АМР-дезаминазы (рис. 1), не совпадает с описанным в работах Ogasawara и соавт. [6] и Арутюняна и соавт. [7] для фермента из мозга крыс. Это отличие касается как концентраций КСl, при которых элюируются фракции АМР-дезаминазы, так и величин K_m этих фракций. В некоторых исследованиях [6, 7] элюирование изофермента производилось при более низких концентрациях КСl, в диапазоне 0,25—0,8 М, тогда как в настоящей работе при 0,8 М КСl происходит элюирование лишь второго пика активности фермента. При этом наблюдается также некоторое различие в регуляторных свойствах соответствующих молекулярных форм АМР-дезаминазы, полученных нами из мозговой ткани крупного рогатого скота и описанных для фермента из мозга крыс. Так, например, имеются данные [18], что наличие в пробах уже 50 мМ КСl или NaCl меняет характер зависимости ферментативной активности от концентрации субстрата: кривая из сигмовидной превращается в гиперболическую. В нашем же случае в присутствии этих и более высоких концентраций КСl (100—200 мМ) кривая все еще сохраняет свою сигмовидальную форму. Кроме того, согласно имеющимся данным [18], добавление 2,5 мМ АТР оказывает стимулирующее воздействие на активность фермента, изменяя форму кривой только для фракций, элюируемых при низких концентрациях КСl. Фракции же, элюируемые при более высокой ионной силе (0,75 М КСl), остаются нечувствительными к добавке АТР. Полученные нами результаты свидетельствуют об одинаковой степени чувствительности, проявляемой всеми молекулярными формами фермента из мозговой ткани к пониженной концентрации АТР.

В настоящее время продолжают исследования по очистке описанных фракций с целью проведения более тщательных кинетических определений и выяснения изоферментной картины АМР-дезаминазы из мозговой ткани крупного рогатого скота.

ISOLATION OF AMP-DEAMINASE MOLECULAR FORMS FROM THE CATTLE NERVE TISSUE

SHAROYAN S. G., MARDANIAN S. S., HAROUTJUNIAN A. V.

H. Ch. Puniat'an Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia,
Yerevan

It is worked out an assay for AMP-deaminase isolation from different parts of brain: from grey substance and, for the first time from the cattle's adenohypophysis. For the gradient elution of the enzyme from the affinity sorbent of PII phosphocellulose it is used a large scale of KCl concentrations (0,2—2,0 M). It is worked out a sensitive method for determination of enzyme activity on fluorescence of O-phthalaldehyde complex with ammonia, the product of reaction. The methods used let us show that in the studied parts of brain the AMP-deaminase is represented in six molecular forms. Comparative investigation of some kinetic properties of one enzyme form (in more available quantities) is made.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Wa'anabe T. Eur. J. Biochem., v. 87, p. 297—304, 1978.
2. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y. Comp. Biochem. Physiol., v. 76B, p. 471—473, 1983.
3. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Wa'anabe T., Asano T. Biochim. Biophys. Acta, v. 714, p. 298—306, 1982.
4. Ogasawara N., Goto H., Yamada Y., Wa'anabe T. Int. J. Biochem., v. 16, p. 269—273, 1984.
5. Raggi A., Bergamini C., Ronga G. FEBS Letters, v. 58, p. 19—23, 1975.
6. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T. FEBS Letters, v. 8, p. 245—248, 1975.
7. Арутюнян А. В., Ловенштейн Дж. Докл. АН СССР, т. 234, с. 951—954, 1977.
8. Setlow B., Lowenstein J. J. Biol. Chem., v. 242, p. 607—615, 1967.
9. D. Rhoads Ph. D. Thesis, Waltham, Mass. Bracis University, 1969.
10. Sugawara K., Oyama F. J. Biochem., v. 89, p. 771—774, 1961.
11. Goyal S., Rains D., Kuffaker S. Anal. Chem., v. 60, p. 175—179, 1988.
12. Молочкина Е., Боровок Н. Нейрохимия, т. 8, с. 311—312, 1989.
13. Bradford M. Anal. Biochem., v. 72, p. 248—254, 1975.
14. Smiley K., Suelter C. J. Biol. Chem., v. 242, p. 1980—1985, 1967.
15. Dixon M. Biochem. J., v. 55, p. 170—176, 1953.
16. Setlow B., Lowenstein J. J. Biol. Chem., v. 243, p. 6216—6221, 1968.
17. Арутюнян А. Вопр. биохимии мозга, т. 9, с. 251—272, 1974.
18. Ogasawara N., Goto H., Watanabe T., Kawamura Y., Yoshino M. Biochim. Biophys. Acta, v. 364, p. 353—361, 1974.

Поступила 8. V. 1998

УДК 577.175.522.882

СВОЙСТВА ЭНДОГЕННОГО ФАКТОРА,
РЕГУЛИРУЮЩЕГО АКТИВНОСТЬ Na^+ , K^+ -АТФазы

ЕРОХОВ П. А.

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова АН РА

Хроматографией на фенол-сефарозе проведена частичная очистка регуляторного фактора, выделяемого в инкубационную среду, семьявносящими протоками крысы. При дальнейшей очистке изофокусировкой в диапазоне ИЭТ 4—7 обнаружены две активные фракции (5,1 и 5,9), незначительно влияющие на активность Na^+ , K^+ -АТФазы, но их смесь активирует ее также, как исходная инкубационная среда. При действии смесей этих фракций в разных соотношениях на Na^+ , K^+ -АТФазу обнаружен максимум активации при определенном соотношении фракций. Полученные результаты позволяют предположить, что регуляторный фактор состоит из двух белков.

Ранее было установлено, что активация или торможение постсинаптических адренорецепторов вызывает выделение из эффекторной клетки веществ (регуляторный фактор), которые тормозят или активируют скорость накопления норадреналина в адренергическом нейроне, изменяя скорость его синтеза или нейронального захвата [1]. Эти данные показывают возможность локальной обратной трансинаптической регуляции активности адренергического нейрона в соответствии с функциональным состоянием эффекторной клетки. Ранее было показано, что эти вещества имеют белковую природу и регулируют процесс захвата норадреналина через изменение активности Na^+ , K^+ -АТФазы [2]. Целью настоящей работы является дальнейшее изучение химической природы этих регуляторов и механизма их взаимодействия с Na^+ , K^+ -АТФазой.

Материалы и методы

Работа выполнена на взрослых крысах линии *Wistar* массой 180—250 г.

Раствор А содержал (в мМ): NaCl —150, KCl —50, MgCl —2 и трис- HCl —50, pH 7,68; раствор В— KCl —200 и трис- HCl —50 («Uitrol», «Calbiochem», США), соли для спектрального анализа—отечественного производства квалификации ос.ч.

Для получения фактора фармакологическим воздействием в течение 1 ч проводили инкубацию изолированных органов (семьявно-

сящие протоки или матки) в растворе А с добавлением 5 мкМ фен-толамина или пропранолола.

Для ультрафильтрации белковых растворов использовали ячейку ФМ-001 и фильтры фирмы «Millipore» (США) с M_r исключения 10 кД. Ультрафильтрацию проводили при температуре 4° под давлением азота 4 кгс/см.

Препарат Na^+ , K^+ -АТФазы получали экстракцией 6 М NaCl из синапсом мозга крыс [2].

Активность Na^+ , K^+ -АТФазы измеряли по образованию неорганического фосфата по методу Lowry, Lopes [3].

Для определения величины M_r белков использовали электрофорез в ПААГ, содержащем ДДС-Na—ДДС [4].

Аналитическую фокусировку проводили в ПААГ, содержащем (в %): акриламид—4, метилен-бисакриламид—0,0012, манит—10, амфолины—2. Толщина геля составляла 0,5 мм. В качестве электродных растворов использовали 0,05 NH_3PO_4 и 0,05 N КОН. Для ИЭФ в широком диапазоне рН использовали 2% амфолинов, рН 3,5—10, в диапазоне рН 4—7 смесь амфолинов следующего состава: 1 часть рН 3,5—10, 4 части рН 4—6, 4 части рН 5—7.

Для ИЭФ белков в микропрепаративных количествах использовали гранулированный гель сефадекс G-50 («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция). ИЭФ проводили при 4° в режиме стабилизации мощностью 6 Вт на пластинку 9×12 см (напряжение в начале 250 В в конце 1200 В). Состав амфолинов был тот же, что и в случае аналитической фокусировки. После окончания фокусирования гель собирали шпателем полосками по 5 мм в пробирки и элюировали белки 2 мл 50 мМ трис-HCl буфера, рН 7,6.

Результаты исследования

Инкубационную среду центрифугировали для отделения от клеток и наносили на колонку с фенил-сефарозой CL-6B объемом 15 мл. Колонку промывали раствором В до снижения оптической плотности E^{280} до исходного уровня. Белки элюировали понижающимся линейным градиентом ионной силы. Для построения градиента применяли «Ultragrad» (LKB, Швеция), раствор высокой ионной силы (раствор В), раствор низкой ионной силы (дистиллированная вода). Профиль элюции белков с колонки с фенил-сефарозой CL 6B показан на рис. 1. В дальнейшем проводили выделение фракции, содержащей регуляторный фактор, на фенил-сефарозе CL 6B, используя ступенчатый градиент ионной силы, что позволило сократить время хроматографии и получить более концентрированные фракции. Отмывали колонку от несвязавшихся белков раствором В и элюировали активную фракцию, используя раствор В/вода (1:9).

Для оценки эффективности очистки фактора на фенил-сефарозе CL 6B отдельные фракции, элюируемые с колонки, были сконцент-

рированы ультрафильтрацией. В них в исходной инкубационной среде и в среде, прошедшей через фенил-сефарозу, измеряли белок по Lowry [3] (табл. 1).

Таблица 1

Распределение белка и активности регуляторного фактора по фракциях, полученных при хроматографии инкубационной среды на фенил-сефарозе CL-6B

Элюент	Количество белка (мМ)	Активность Na^+ , K^+ -АТФазы в процентах к контролю
Несорбированный белок	4205 ± 673	98
250 мМ КСl	2060 ± 215	100
30 мМ КСl	1.6 ± 1.2	154
Дистиллированная вода	564 ± 93	96
1 %-ный раствор тритон X-100	1272 ± 230	78

Примечание. В таблице приведена реальная ионная сила, определенная во фракциях кондуктометрическим методом.

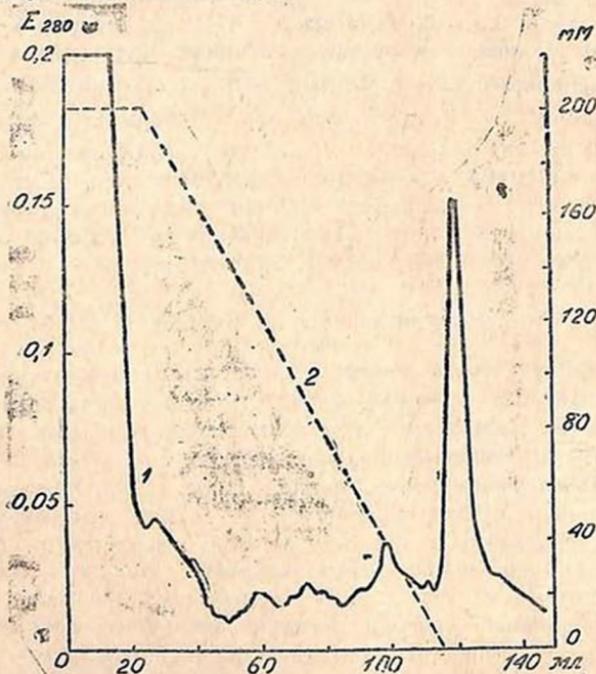


Рис. 1. Элюция белков инкубационной среды с фенил-сефарозы линейным градиентом ионной силы от 200 мМ КСl до 0. 1 — поглощение при 280 нм, 2 — ионная сила

Фракция, содержащая регуляторный фактор, составляет 1/2000 от общего белка, выделившегося в инкубационную среду, и коли-

чество белка в ней является наименее стабильным по отношению к другим пикам, элюируемым с фенол-сефарозы CL 6B.

Для проведения ИЭФ (диапазон ИЭТ 3,5—10) среду, содержащую фактор, концентрировали ультрафильтрацией. Исходный объем был доведен до 0,5 мл, и 50 мкл были нанесены на ПААГ-пластинку толщиной 1 мм, содержащую амфолины. После окончания фокусирования дорожку с образцом 50 мкл вырезали, разрезали на

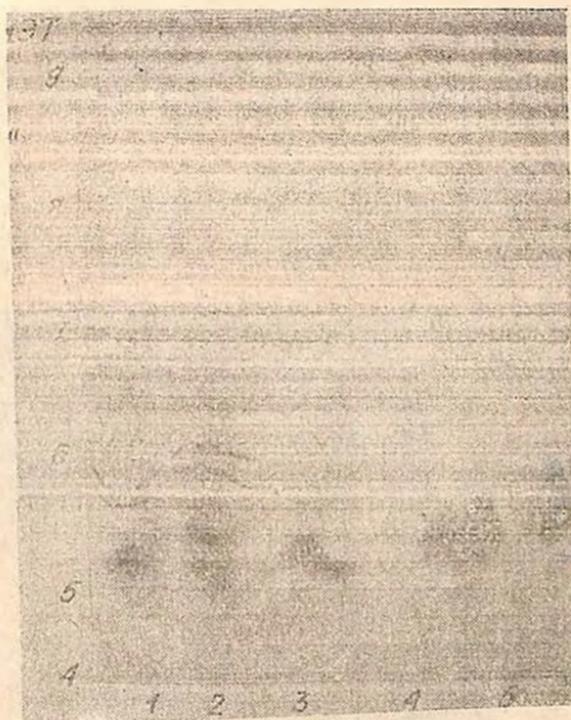


Рис. 2. ИЭФ фракций белков инкубационной среды, содержащей регуляторный фактор, полученных на фенол-сефарозе: 1—исходная среда; 2—белки, не связавшиеся с фенол-сефарозой; 3—фракция, элюируемая при 20 мМ KCl, 4—фракция, элюируемая водой, 5—фракция, элюируемая 1%-ным раствором тритона X-100

кусочки по 5 мм вдоль градиента pH и элюировали 1 мл трис-HCl буфера, pH 7,2, 50 мМ, при 4°. Параллельно так же обрабатывали пустую дорожку, но элюцию проводили дистиллированной водой для определения pH. Остальной гели окрашивали Кумасси R-250 (рис. 2). Элюаты тестировали по способности изменять активность Na⁺, K⁺-АТФазы. Для этого их разводили раствором А в 10 раз и дальше работали так же, как с инкубационной средой.

Как видно из табл. 2, вся активность заключена в интервале рН 5—6, там же сосредоточена основная масса белка.—

Исходно была проведена аналитическая фокусировка в интервале рН 4—7, причем параллельно были нанесены белки и других фракций, получаемых при хроматографии белков инкубационной

Таблица 2

Тестирование фракций ИЭФ (диапазон ИЭТ 4—9)
по активности Na^+ , K^+ -АТФазы в U 10-3

рН	4,0	5,0	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5	9,0	Контроль
Активность	2,0	1,8	3,3	2,0	1,8	1,5	1,5	1,5	2,0	2,0

среды на фенил-сефарозе CL 6B (рис. 3, а). Активная фракция, получаемая с фенил-сефарозы, содержит большое количество бендов, перекрывающих весь интересующий диапазон рН. Однако ДДС-форез этих образцов демонстрирует относительно небольшое коли-

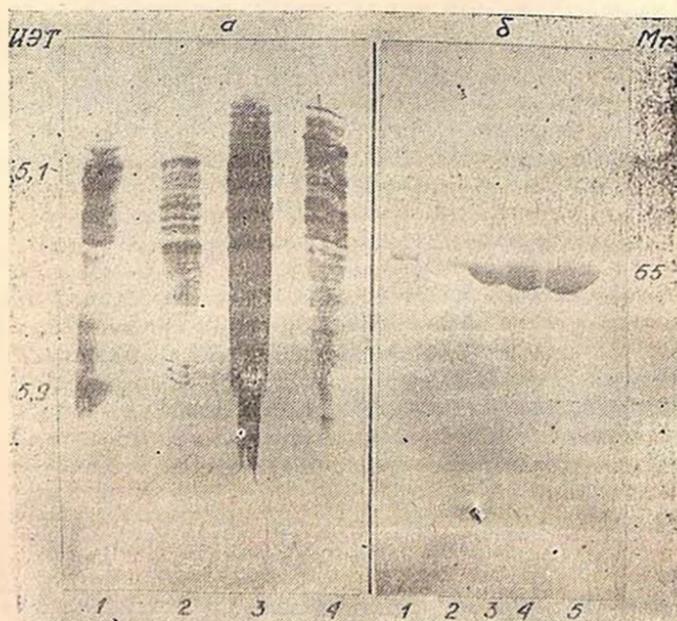


Рис. 3. ИЭФ (а) и ДДС-форез (б) фракций белков инкубационной среды, содержащей регуляторный фактор, полученных на фенил-сефарозе: 1 а и 3 б—фракция, элюируемая при 20 мМ КСI; 2а, 4 б—фракция, элюируемая водой; 3 а и 5 б—фракция, элюируемая 1%-ным раствором тритона X-100; 4 а и 2 б—белки, не связавшиеся с фенил-сефарозой; 1 б—исходная среда

чество белков, причем один мажор в области 65 кД (рис. 3, б). Этот мажорный белок присутствует практически во всех фракциях, получаемых с фенил-сефарозы CL 6В, и по M_r соответствует сыво-

Таблица 3

Действие фракций фактора, регулирующего активность Na^+ , K^+ -АТФазы, полученных ИЭФ, на активность Na^+ , K^+ -АТФазы

pH фракции	5,9	5,1	5,9:5,1 1:1
Активность Na^+ , K^+ -АТФазы по отношению к контролю	$1,12 \pm 0,18$	$0,83 \pm 0,36$	$1,63 \pm 0,07$

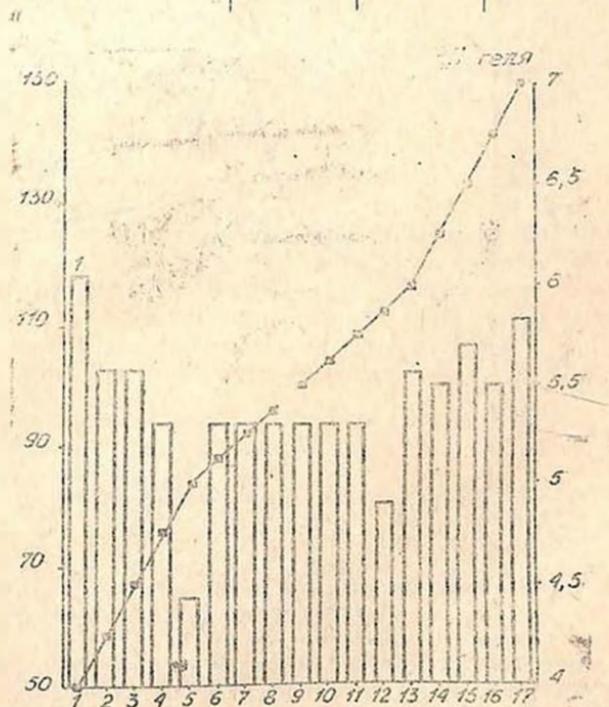


Рис. 4. Распределение активности регуляторного фактора при ИЭФ в диапазоне pH 4—7. По оси абсцисс—номера фракций. Здесь и на рис. 5 по оси ординат—относительная активность Na^+ , K^+ -АТФазы в % к контролю

роточному альбумину крысы. Препаративное разделение фракции, содержащей регуляторный фактор, полученной на фенил-сефарозе CL 6В, осуществляли в гранулированном геле, сефадексе G-50. После окончания ИЭФ гель разделяли на фракции вдоль градиента pH с

интервалом 5 мм, из которых элюировали белок раствором А и проверяли их действие на Na^+ , K^+ -АТФазу. Градиент рН был построен так, что в интервале от 5 до 6 на 5 мм геля приходилась 0,1 единица рН. Результаты тестирования представлены на рис. 4. Фракции с ИЭТ 5,1 и 5,9 не вызывают статистически достоверного изменения активности Na^+ , K^+ -АТФазы, но приводят к значительному разбросу активности фермента в параллельных пробах. Однако при смешивании их друг с другом (в соотношении 1:1 по объему) происходит активирование Na^+ , K^+ -АТФазы (табл. 3). Соседние фракции таким свойством не обладали. Фракции с ИЭТ 5,1 и 5,9 были смешаны в различных соотношениях таким образом, что концентрация одной фракции линейно нарастала, а другой—

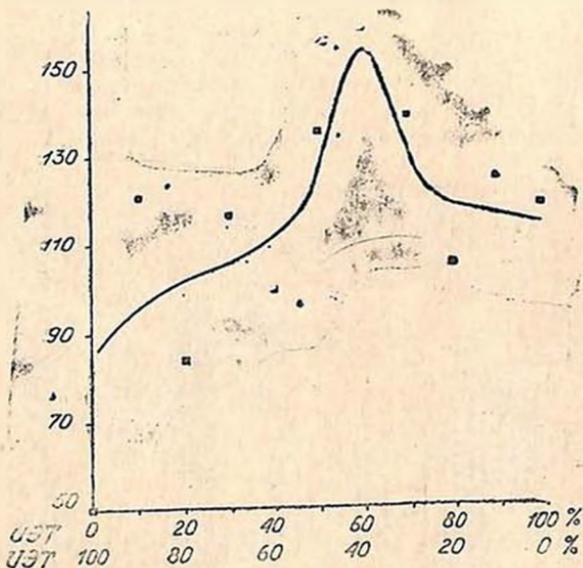


Рис. 5. Зависимость активности Na^+ , K^+ -АТФазы от соотношения компонентов фактора

уменьшалась от пробы к пробе. Полученными смесями действовали на Na^+ , K^+ -АТФазу. Результаты представлены на рис. 5, откуда хорошо видно, что активация Na^+ , K^+ -АТФазы происходит в весьма узком интервале соотношений компонентов фактора, причем имеется ярко выраженный максимум.

Результаты и обсуждение

Регуляторный фактор обеспечивает определенный уровень поступления катехоламинов к клетке за счет отрицательной обратной связи: при действии адrenoблокаторов активирует нейрональный захват катехоламинов и тирозина, при действии адrenomиметиков—ингиби-

руст. Очевидно, что физиологическим является только один из наклонных участков этой кривой (рис. 5), однако сейчас невозможно сказать, который из них является физиологическим.

Высокая молекулярная масса между 25 и 100 кД [5] и ИЭТ двух фракций регуляторного фактора указывают на его белковую природу. Можно предположить, что регуляторный фактор является системой из двух ферментов, регулирующих активность Na^+ , K^+ -АТРазы, и через это уровень нейронального захвата норадреналина и тирозина [6]. Судя по характеру зависимости активности Na^+ , K^+ -АТРазы от соотношения фракций фактора наиболее вероятным механизмом действия регуляторного фактора является изменение вязкости мембраны.

PROPERTIES OF ENDOGENIC FACTOR REGULATING THE ACTIVITY OF Na^+ , K^+ -ATPase

EROCHOV P. A.

N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology, Moscow

Partial purification of regulatory factor from incubation media was done by phenyl-sepharose chromatography. At further purification of the active fraction by IEF in the range pH 4—7 there were demonstrated two fractions with pI 5.1 and 5.9. These two fractions change of Na^+ , K^+ -ATPase activity on ratio of fractions activity in mixtures was studied. The results obtained suggest that the regulation factor consists at least of two proteins.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Манухин Б. Н., Волина Е. В. Физиол. журн. СССР, т. 64, № 10, с. 1406—1413, 1978.
2. Nakao T., Nakao M., Nagai F., Fujihira Y., Hara Y., Fujita M. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 19, p. 755, 1965.
3. Lowry O. H., Lopez J. J. Biol. Chem., v. 162, p. 421, 1941.
4. Laemmli U. K. Nature, v. 227, p. 680—685, 1970.
5. Ерохов П. А. Тезисы докл. Всесоюзной конференции «Механизмы действия медиаторов и гормонов на эффекторные клетки», Суздаль, 1989.
6. Ерохов П. А., Волина Е. В. Физиол. журн. СССР, т. 74, № 4, с. 586—588, 1988.

Поступила 18. XII. 1991

УДК 577.152.18

АКТИВНОСТЬ ГЛУТАТИОНРЕДУКТАЗЫ И ГЛУТАТИОНТРАНСФЕРАЗЫ В ТКАНЯХ КРОЛИКОВ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СОТРЯСЕНИЯ МОЗГА

МАРЧЕНКОВ Ф. С., ВАСИЛЬЕВА И. Г., ВЕМБЕР В. В.,
НАГОРНАЯ С. Л., ВАСИЛЬЕВ А. П.

НИИ нейрохирургии
Государственный университет им. Т. Г. Шевченко, Киев

Исследована активность глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы в цитозольной и микросомной фракциях головного мозга и печени кроликов в динамике экспериментального сотрясения мозга через 15 мин, 2 ч, 1, 3, 7 и 14 суток. Установлено, что активность глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы в обеих фракциях, выделенных из тканей мозга, а также активность глутатионтрансферазы в печени выше контрольного значения в 1,5—2 раза во все исследованные сроки после травмы по сравнению с контролем. Активность глутатионредуктазы в цитозольной и микросомной фракциях печени повышается только через 3 суток после экспериментального сотрясения мозга. Соотношение активности глутатионтрансферазы и глутатионредуктазы свидетельствует о том, что в посттравматическом периоде существует нарушение динамического равновесия между процессами утилизации и синтеза восстановленного глутатиона.

Черепно-мозговая травма сопровождается множественными нарушениями функционирования ЦНС [1, 2], что является следствием развития дисбаланса процессов саморегуляции метаболизма на клеточном уровне [3—8]. Изменение гомеостаза нервных клеток вызывается нарушением мозговой гемодинамики вследствие сопровождающего травму массового выброса нейромедиаторов [9]. Одной из реакций на травматическое воздействие со стороны нервной ткани является мобилизация адаптационных механизмов клетки, среди которых существенная роль принадлежит универсальной глутатионзависимой антиокислительной системе [10].

Анализ собственных и литературных данных позволяет предположить, что в развитии патогенеза черепно-мозговой травмы на метаболическом уровне возможно существование этапа токсической атаки. Предпосылкой для накопления в клетках организма токсических веществ является нарушение метаболизма кислорода, и как следствие, несбалансированное образование его активных производных. Кроме того, токсические процессы также интенсифицируются в очагах механического повреждения нервной ткани вследствие лик-

ворного толчка [2]. При токсическом поражении отношение активностей глутатионтрансферазы к глутатионредуктазе изменяется в пользу глутатионтрансферазы [10—12].

Исследование метаболизма других тканей обусловлено необходимостью поиска причин возникновения соматических нарушений в отдаленном посттравматическом периоде.

Целью настоящего исследования являлось изучение активности глутатионтрансферазы и глутатионредуктазы в динамике экспериментального сотрясения мозга (ЭСМ) в ткани мозга и печени кроликов.

Эксперименты проведены на 42 кроликах-самцах породы серый великан массой 2—2,5 кг. Дозированную легкую черепно-мозговую травму наносили, как описано в работе Ромоданова и соавт. [13].

Активность ферментов определяли в цитозоле после центрифугирования при 100000g и в микросомной фракции после центрифугирования 8000 g.

Активность глутатионредуктазы оценивали по скорости утилизации ферментом субстратов NADPH и окисленного глутатиона [14], активность глутатионтрансферазы определяли по скорости утилизации 1-хлор, 2,4-динитробензола [15].

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [16]. Полученные данные обработаны статистически [17].

Результаты определения активности глутатионтрансферазы и глутатионредуктазы в ткани мозга кроликов в динамике ЭСМ представлены в табл. 1, из которой видно, что уже через 15 мин после травмы активность глутатионредуктазы увеличивается в 1,5 и 1,7 раза в цитозольной и микросомной фракции головного мозга соответственно. Активность глутатионтрансферазы через 15 мин после травмы в цитозольной фракции повышается по сравнению с контролем в 1,7 раза, а в микросомной фракции активности глутатионредуктазы остается на уровне контрольной величины. Через 2 ч после травмы активность глутатионтрансферазы увеличивается в 2,2 раза в цитозольной и в 2,7 раза в микросомной фракциях, затем несколько снижается, превышая, однако, контрольную величину в 1,7 раза в последующие сроки (1,3 и 7 суток). Через 14 суток после ЭСМ активность глутатионтрансферазы превышает контрольное значение в 1,5 и в 2,7 раза в цитозольной и микросомной фракциях соответственно. Активность глутатионредуктазы через 2 ч и сутки в цитозольной фракции головного мозга превышает контрольное значение в 1,8 раза, через 3 суток активность несколько снижается, через 7 суток незначительно отличается от контроля, однако через 14 суток после травмы активность глутатионредуктазы снова возрастает и превышает контрольное значение в 1,7 раза. В микросомной фракции через 2 ч и 14 суток активность глутатионредуктазы также превышает контроль в 2,2 и 1,9 раза соответственно. Полученные результаты указывают на активацию после ЭСМ в ткани мозга глутатионзависимой антиоксидентной си-

Таблица 1

Активность глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы в мозгу кроликов
в динамике экспериментального сотрясения мозга

Цитозоль		Контроль	15 мин	2 ч	1 сутки	3 сутки	7 суток	14 суток
Активность глутатионредуктазы (нМ NADPH/мг белка/мин)	М	22,1	*34,3	*41,4	*43,0	*29,1	26,1	*39,6
Активность глутатионтрансферазы (нМ 1-хлор-2, 4-динитробензола/мг белка/мин)	М	0,4	*0,7	*1,1	*0,7	*0,7	*0,7	*0,6
Активность глутатионтрансферазы активности глутатионредуктазы	М	0,0	0,2	0,2	0,1	2,0	0,2	0,1
	М	0,018	0,020	0,026	0,016	0,024	0,027	0,015
Микросомная фракция								
Активность глутатионредуктазы (нМ NADPH/мг белка/мин)	М	0,61	*1,04	*1,40				*1,19
Активность глутатионтрансферазы (нМ 1-хлор-2, 4-динитробензола/мг белка/мин)	М	0,08	0,17	0,16				0,13
Активность глутатионтрансферазы активности глутатионредуктазы	М	0,19	0,15	*0,53				*0,53
Активность глутатионтрансферазы активности глутатионредуктазы	М	0,06	0,03	0,14				0,11
Активность глутатионтрансферазы активности глутатионредуктазы	М	0,31	0,14	0,38				0,45

Примечание. * $p < 0,05$.

стемы в тканях и подтверждают предположение об активации в ткани мозга свободнорадикальных процессов. В случае сохранения динамического равновесия в системе антиокисления пропорционально росту активности глутатионтрансферазы должна возрастать и активность глутатионредуктазы. Такое динамическое равновесие поддерживается до 3 суток после ЭСМ. К первым суткам после травмы, несмотря на значительное увеличение активности обоих ферментов по сравнению с контролем, соотношение их практически не отличается от такового в контроле. На третьи сутки, как можно судить из полученных данных, величина соотношения активности глутатионтрансферазы и глутатионредуктазы возрастает. Такая же закономерность установлена нами и через 7 суток после ЭСМ, что указывает на снижение антиокислительного потенциала в нервной ткани. К 14 суткам после ЭСМ активность глутатионредуктазы снова возрастает, что приводит к восстановлению динамического равновесия. Соотношение активностей исследуемых ферментов при этом возвращается к контрольному значению.

В табл. 2 представлены данные по определению активности глутатионтрансферазы и глутатионредуктазы в печени кроликов в динамике ЭСМ. Необходимо отметить, что в ткани печени также активируются антиокислительные процессы, однако динамика этих изменений несколько отличается от таковой в тканях мозга. Так, активность глутатионредуктазы в цитозольной и микросомной фракциях в печени в посттравматическом периоде практически не отличается от контрольных значений. В цитозольной фракции увеличение активности глутатионредуктазы в 1,7 раза установлено через 7 суток, активность же глутатионтрансферазы, по нашим данным, выше контрольного значения в 1,5—2 раза практически во все исследованные сроки после нанесения травмы (через 2 ч, 3, 7, 14 суток). Повышенной оказалась активность глутатионтрансферазы и в микросомной фракции печени. Величина отношения активности глутатионтрансферазы к активности глутатионредуктазы превышает контрольное значение через 2 ч, 7 и 14 суток после ЭСМ. Полученные данные свидетельствуют о существовании неоднородности в активации свободнорадикальных процессов в печени в динамике ЭСМ. На основании анализа данных об изменении активности глутатионтрансферазы и глутатионредуктазы, а также их соотношения в динамике ЭСМ, можно утверждать, что в посттравматическом периоде существуют периоды резкой активации антиокислительных процессов и нарушения динамического равновесия между процессами утилизации и синтеза восстановленного глутатиона и ферментом, его синтезирующим. Возникновение и развитие такой диспропорции может приводить к недостаточной утилизации свободных радикалов, высокая реакционная способность которых оказывает деструктивное влияние на организацию мембранных комплексов [13].

Активация антиокислительных процессов в ткани печени, наблюдаемая в динамике ЭСМ, может быть объяснена развитием адап-

Таблица 2

Активность глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы в печени кроликов
в динамике экспериментального сотрясения мозга

Цитозоль	Контроль	15 мин	2 ч	1 сутки	3 суток	7 суток	14 суток
Активность глутатионредуктазы (нМ NADPH/мг белка/мин)	75,0 13,2	82,3 17,4	74,0 7,8	69,6 6,2	134,4 23,4	52,4 6,5	68,6 9,9
Активность глутатионтрансферазы (нМ 1-хлор-2, 4-динитробензола/мг белка/мин)	3,3 0,4	4,1 1,4	7,0 1,5	3,5 0,4	*5,8 0,9	*5,1 0,7	*5,9 1,1
Активность глутатионтрансферазы; активность глутатионредуктазы	0,044	0,049	0,094	0,050	0,043	0,097	0,085
Митохондриальная фракция							
Активность глутатионредуктазы (нМ NADPH/мг белка/мин)	10,67 1,81	16,50 2,19	15,20 2,37				10,00 1,0
Активность глутатионтрансферазы (нМ 1-хлор-2, 4-динитробензола/мг белка/мин)	1,97 0,23	2,63 0,60	4,48 0,75				4,66 0,87
Активность глутатионтрансферазы; активность глутатионредуктазы	0,18	0,16	0,29				0,45

Примечание. *p<0,05.

тационных изменений. Адаптационные реакции зависят от особенностей гормональной регуляции и, вероятно, повышенного содержания циклических нуклеотидов в ткани печени и других тканях, что, как известно, влияет на активность глутатионтрансферазы [18].

Таким образом, проведенные нами исследования свидетельствуют о том, что в динамике ЭСМ происходит активация универсальной антиокислительной системы. Разнонаправленное повышение активности глутатионтрансферазы и глутатионредуктазы указывает на возможные нарушения равновесия в системе глутатионзависимой детоксикации, что может быть одной из причин морфологических изменений, обнаруживаемых в посттравматическом периоде.

■

GLUTATHIONE TRANSFERASE AND GLUTATHIONE REDUCTASE ACTIVITY IN RABBITS' BRAIN AND LIVER IN DYNAMICS OF EXPERIMENTAL EASY BRAIN INJURY

MARCHENKOV F. S., VASILJEVA I. G., VEMBER V. V., NAGORNAYA S. L.,
VASILJEV A. N.

Institute of Neurosurgery, T. G. Shevchenko State University, Kiev

The activities of glutathione transferase and glutathione reductase in cytosolic and microsomal fractions of brain and liver of rabbits at experimental easy brain injury (EEBI) were studied. It has been defined that the activity of glutathione reductase and glutathione transferase, both fractions from brain, increased the control 1,5–2-fold during 14 days after injury. The activity of glutathione reductase in cytosolic and microsomal fractions of liver becomes higher than that of control only after 3 days of EEBI. The activity of glutathione transferase, a fraction from liver, is higher than that of control 1,5–2-fold during the whole period of EEBI.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Гельфанд В. Б., Маламуд Н. Д., Истратов В. Г. Застытая черепно-мозговая травма, Киевский, Штаница, 1986.
2. Клумбис Л. А. Нейрофизиология острой черепно-мозговой травмы, Вильнюс, Моклас, 1976.
3. Прохоров М. Ш., Тигранян С. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 2, с. 46–48, 1969.
4. Прохоров М. Ш., Смирнов А. В., Аюбян А. С. Нейрохимия, т. 1, с. 3–6, 1982.
5. Прохоров М. Ш. Обмен веществ в мозге и его регуляция при черепно-мозговой травме, М., Медицина, 1984.
6. Васильев И. Г., Чопик И. Г., Копьев О. В., Васильев А. Н. Докл. АН УССР, № 7, с. 9–11, 1990.
7. Васильев И. Г., Копьев О. В., Минченко А. Г. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 1, с. 25–27, 1991.
8. Зинчук В. С. Врачеб. дело, № 3, с. 18–21, 1989.
9. Rossner M. S., Mewsome M. M., Becler D. P. J. Neurosurg., v. 61, № 1, p. 76–86, 1981.

10. *Morgenstern R., De Rierre J. W.* *Gen. Physiol. Toxicology*, v. 1, p. 67-103 1985.
11. *Васильева И. Г., Марченко Ф. С.* *Нейрохирургия*, Киев, Здоровье, т. 23, с. 240—245, 1990.
12. *Васильева И. Г., Марченко Ф. С.* *Всесоюзный симпозиум по черепно-мозговой травме*, Кабулетти, с. 102, 1988.
13. *Ромоданов А. П., Тушевский В. Ф., Копьев О. В.* *Вопр. нейрохирургии*, № 1, с. 16—24, 1987.
14. *Lana K., Augustin R. C.* *Exp. Funct. Res.*, v. 39, № 8, p. 343—354, 1974.
15. *Habig W., Rabs! M. I., Jacoby B. W. G.* *J. Biol. Chem.*, v. 249, p. 7130—7139, 1974.
16. *Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. H., Randall R. I. J.* *Biol. Chem.*, v. 193, № 1, p. 265—268, 1951.
17. *Виноградова Р. П., Кучеренко Н. Е., Литвиненко А. П.* *Экологічна хімія*, Київ, Вища школа, 1977.
18. *Калесниченко Л. С., Ланкий В. З.* *Біохімія*, т. 287, с. 735—737, 1986.

Поступила 11. X. 1991

УДК 577.112

ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНАЯ ФОСФОЛИПАЗА A_2
 ИЗ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА.
 ОЧИСТКА И НЕКОТОРЫЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

АПАНЯН А. Е.

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

Серое вещество мозга быка содержит растворимую высокомолекулярную форму фосфолипазы A_2 . Разработана методика ее выделения и очистки, включающая гель-фильтрацию, гидрофобную, ионообменную и аффинную колоночные хроматографии. По данным ПААГ, электрофорез с ДДС-Na является Ca^{2+} -зависимым, фермент имеет M_r около 100 кД, гидролизует фосфолипиды предпочтительно с остатком арахидоновой кислоты в *sn* 2-положении, действует при pH 8,5, концентрации ионов металла 10 мМ в *in vitro* измерениях, в условиях, способствующих выявлению гидролитической активности.

Внутриклеточные фосфолипазы A_2 стали в настоящее время объектом широкого исследования, поскольку в весьма низких концентрациях они вовлекаются в ключевые клеточные процессы, регулируя образование арахидонатов и в последующем синтез простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов [1]. В ЦНС указанные эйкозаноиды в физиологических условиях играют роль нейромодуляторов, регуляторов температуры тела, цикла сна, нейросекреции гормонов, процессов восприятия и сознания. Внутриклеточные фосфолипазы A_2 как медиаторы функционируют при агрегации тромбоцитов, митогенезе лимфоцитов, хемотаксисе лейкоцитов, высвобождении гистамина. В патологии (ишемия, гипоксия, конвульсия) тоническое высвобождение арахидоновой кислоты также происходит через систему активации фосфолипазы A_2 . Однако комплексная природа регуляции, а также физиологические механизмы внутриклеточных фосфолипаз A_2 как в мозгу, так и в других тканях до сих пор остаются недостаточно выясненными. К настоящему времени известно существование ряда изоферментов внутриклеточных иммунологически неидентичных фосфолипаз A_2 , отличающихся от секреторных фосфолипаз A_2 , но в целом относящихся к категории Ca^{2+} -зависимых и гормонально регулируемых ферментов, принимающих активное участие в увеличении уровня внутриклеточных ионов кальция [2—4].

Ранее нами сообщалось о выделении и очистке фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД из мозга крупного рогатого скота [5]. Настоящая работа посвящена выделению высокомолекулярной Ca^{2+} -зависимой

фосфолипазы A_2 из мозга быка, а также изучению ее некоторых физико-химических свойств.

Материалы и методы

Мозг быка брали сразу после забоя и помещали на лед.

Использовали сефадексы и фенил-сефарозу фирмы «Pharmacia» (Швеция), ионообменники и хроматографические колонки фирмы «Whatman» (Англия) и отечественного производства, аффинный сорбент на основе аминокстекла, аппарат для ультрафильтрации («Amicon», США), диспергатор ультразвуковой УЗДН-2Т (СССР), установку для колоночной хроматографии («ЛКВ», Швеция). Тонкослойный электрофорез выделенных белков проводили на аппарате фирмы «ЛКВ» (Швеция), а диск-электрофорез в трубке—на аппарате фирмы «Reanal» (Венгрия). Измерение ферментативной активности осуществляли на автитраторе ТТТ-2 («Radiometer», Дания). Все процедуры проводили при 4°.

25 (50) г свежего мозга гомогенизировали в 75 мл (150 мл) 10 мМ аммоний-ацетатного буфера, pH 7,2, содержащего 0,15 М NaCl, 0,25 М сахарозу и 1 мМ ЭДТА. Для удаления ядер гомогенат центрифугировали при 1000 g 15 мин, надосадочную жидкость подвергали воздействию ультразвука при 22 кГц в течение 0,5—2,0 мин, затем центрифугировали при 90000 g 1 ч, надосадочный раствор желто-коричневого цвета анализа против дистиллированной воды не использовали как источник фосфолипазы A_2 . Первую стадию его хроматографической очистки или ионофилизованного порошка проводили на колонке с сефадексом G-75 sl (1,2 × 140 см), уравновешенным 10 мМ ацетатным буфером, содержащим 0,15 М NaCl, pH 7,2 (рис. 1). Объем каждой фракции в 2 мл отбирали для измерения ферментативной активности в присутствии 0—20 мМ $CaCl_2$ при скорости элюции 6 мл/ч.

Фракцию с фосфолипазной активностью далее концентрировали до 2—3 мл и наносили на колонку с фенил-сефарозой (2,0 × 10 см), в 10 мМ ацетатном буфере, содержащем 5—10 мМ $CaCl_2$, pH 7,2. Как показано на рис. 2, после вымывания стартовым буфером несвязавшихся на колонке белков, адсорбированные белки с фосфолипазной активностью промывали буфером, не содержащим Ca^{2+} (в буфер добавляли 5—10 мМ ЭДТА), а фракции собирали по 3 мл.

Элюат с фосфолипазной липолитической активностью после анализа против дистиллированной воды и концентрирования наполнили на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой, уравновешенной тем же 10 мМ ацетатным буфером (1,5 × 12 см), pH 7,6. Связанные на колонке белки промывали в градиенте ионной силы NaCl от 0 до 0,4 М (2 × 300 мл) со скоростью 20 мл/ч. Все фракции проверяли на фосфолипазную активность.

Последнюю стадию очистки проводили биоаффинной хроматографией на сорбенте, состоящем из липид—лиганда, ковалентно сшитого с аминокстеклом, с использованием колонки размером 1,0 ×

12 см. Условия опыта соблюдались те же, что и при хроматографии на фенол-сефарозе. Осаждение белков на колонке проводили в стартовом ацетатном буфере, содержащем Ca^{2+} . Промывание фосфолипазной активности осуществляли тем же буфером в отсутствие Ca^{2+} .

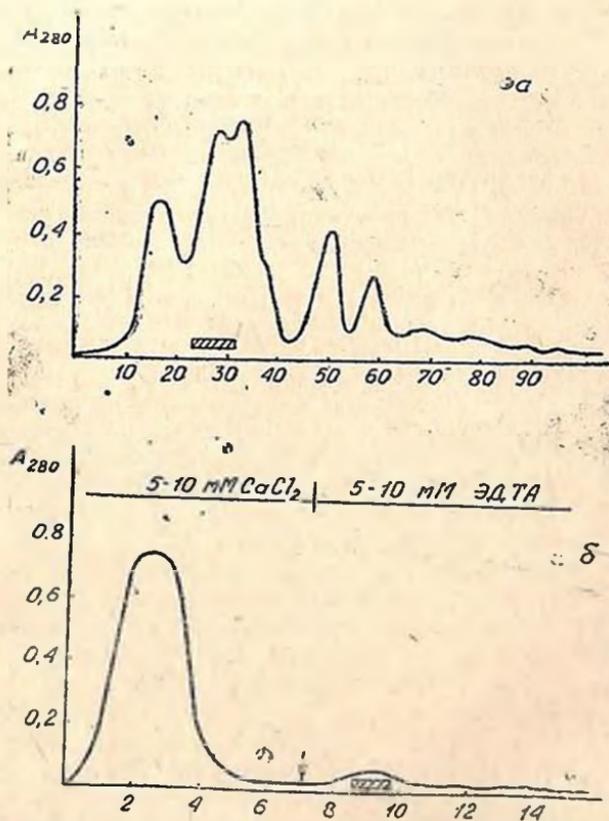


Рис. а. Разделение белковой смеси гомогената мозга животного на колонке с сефардексом G-75 сверхтонкий в 10 мМ аммонийацетатном буфере, содержащем 0,15 м NaCl, pH 7,2. Отмечен пик с фосфолипазной активностью. б. Разделение фракции с фосфолипазной активностью после гель-фильтрации на колонке с фенол-сефарозой, уравновешенной в 10 мМ ацетатном буфере, содержащем 5—10 мМ CaCl_2 , pH 7,2. Фосфолипазная активность элюировалась тем же буфером, но содержащим 5—10 мМ ЭДТА

Фосфолипазную активность на всех стадиях очистки определяли ранее описанным методом ацидометрического титрования [7] с некоторыми изменениями. Реакционная среда содержала 10 мМ Трис, 0,05 м NaCl, 5—20 мМ CaCl_2 , 0,5 мМ ЭДТА, 0,5% детергента тригон X-100, pH 8—8. В качестве субстрата использовали дипальмитонилфосфатидилхолин или 1-пальмитонил-2-арахидонилфосфатидил-

хояли. В инкубационную смесь вносили 1—100 мкг фермента или фракцию с фосфолипазной активностью. Гидролиз проводили при 37°. В отдельных экспериментах по исследованию металлозависимости фосфолипазы A_2 Ca^{2+} были заменены Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} в виде их хлорпроизводных.

Электрофорез в присутствии 0,1% ДДС-Na проводили на пластинках ПААГ (10—20%) согласно известной методике [8]. Индивидуальность белка проверяли с помощью стандартного диск-электрофореза в 15%-ном ПААГ [9].

В измерениях по pH-зависимости ферментативной активности использовали следующие буферные системы: ацетат—Na/уксусная кислота, pH 4,0—6,0, какодлат—Na/HCl, pH 6,0—7,5, трис/HCl, pH 7,5—9,0, глицин/NaOH, pH 9,0—10.

Для определения N-концевого аминокислотного остатка был применен общеизвестный метод дитерминации [10].

Результаты и обсуждение

В качестве источника фермента использовали гомогенаты свежего, а в отдельных опытах—замороженного мозга. Было установлено, что при замораживании в течение 1—2 месяцев фосфолипазная активность в сером веществе почти полностью сохраняется (80—90% от исходной активности). После обработки ультразвуком в течение 1 мин, последующих процедур центрифугирования и диализа концентрат или лиофилизированный порошок надосадочной жидкости подвергали хроматографической очистке.

Как видно из рисунка, при хроматографии белков сульфатамта гомогената мозга на колонке с сепадексом G-75sf (сверхтонкий) основной белковый пик, соответствующий смеси с M_r 60—70 кД, проявлял фосфолипазную активность в присутствии 5—10 мМ Ca^{2+} (45—65 мл). В отсутствие ионов кальция ферментативная активность этой фракции не проявлялась. После гель-фильтрации выход белка по липолитической активности составлял в среднем около 60—70% от исходной в гомогенате. При фракционировании сырого тканевого экстракта с помощью гель-хроматографии, особенно в присутствии NaCl в буферной системе, в разных случаях было обнаружено неодинаковое экспонирование фосфолипазной активности.

Например, M_r этой фракции соответствовала то 60, то \geq 70 кД.

Дальнейшее фракционирование белковой смеси с фосфолипазной активностью осуществляли с помощью гидрофобной хроматографии на фенил-сефарозе (рис. б). Белки, адсорбированные на колонке, содержащие благодаря их Ca^{2+} -зависимости около 85% от исходной ферментативной активности, промывали стартовым буфером, не содержащим Ca^{2+} . Выход активности по завершении этой стадии хроматографии составлял приблизительно 70—75% от исходной.

Диализованную и концентрированную без потерь белковую смесь далее подвергали ИОХ на ДЭАЭ-целлюлозе в ацетатном буфере, pH 7,6. Примерно 80% стартовой фосфолипазной активности удер-

живалось на колонке. Элюирование связавшихся на колонке белков проводили с помощью линейного градиента 600 мл раствора NaCl от 0 до 0,4 М. Вымывание пика, содержащего основную липолитическую активность, достигали при концентрации NaCl примерно 0,26 М. Оно составляло до 60% при скорости элюирования 20 мл/ч. Выявленные при этом другие минорные пики, содержащие низкую ферментативную активность, дальнейшему изучению не подвергали.

Заключительную стадию хроматографической очистки концентрированного раствора фосфолипазы A_2 осуществляли с помощью биоаффинного фракционирования. На этой стадии очистки примерно 90% фермента связывалось на колонке, а условия элюирования фосфолипазной активности и общая картина хроматографии поддерживались в тех же пределах, что и для хроматографии на фенол-сефарозе, обеспечивавшие выход исследуемого материала около 85—90%.

Для измерения ферментативной активности высокомолекулярной фосфолипазы A_2 от pH использовали 4 разные буферные системы, поочередно заменяющие друг друга при pH 4—10. Диапазон pH выделенной фосфолипазы A_2 колеблется в пределах 5—10. Максимальное проявление ферментативной активности наблюдается при щелочных значениях pH 7,5—9,5 в присутствии 10 мМ Ca^{2+} и более конкретно при pH 8,5.

Попытки определить N-концевые аминокислоты выделенной нами фосфолипазы A_2 оказались безуспешными, что мы склонны объяснить недоступностью, возможно, упакованного в глобуле N-конца белка.

Ca^{2+} -зависимость фосфолипазной активности была проверена на примере субстратов дипальмитонилфосфатидилхолина и 1-пальмитонил-2-арахидонилфосфатидилхолина. Было установлено, что при *in vitro* титровании лучшим субстратом для действия высокомолекулярной фосфолипазы A_2 служил последний из них с остатком арахидоновой кислоты. В его присутствии очищенный фермент демонстрирует более чем 3—4-кратную активность. Увеличение в реакционной среде концентрации Ca^{2+} от 100 мкМ до 20 мМ также приводило к повышению фосфолипазной активности, и ее максимальное проявление имело место при наличии в среде Ca^{2+} . Замена последних на другие двухвалентные ионы— Mg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} не приводила к выявлению сколь-нибудь заметной активности фермента.

Сравнивая методику выделения представленной в этой статье высокомолекулярной фосфолипазы A_2 с методикой ранее выделенной нами фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД следует отметить, что в данном случае был применен более мягкий способ выделения ферментного белка, чем в предыдущей работе [5], где гомогенат подвергали более жестким формам обработки—длительному воздействию ультразвуком, 18-часовому отстаиванию и температурной обработке при 70° в течение 5—10 мин, в результате чего большинство лабильных белков необратимо инактивировалось и выпало в осадок, способствуя

тем самым очистке только высокостойкой Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД. Следует отметить, что электрофореграмма, наряду с основной полосой, соответствующей белку с M_r 14 кД, содержала также слабо выраженную полосу с M_r 28—29 кД, что позволяет предположить о существовании димерной структуры фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД.

Обобщая работы по выделению и очистке фосфолипазы A_2 из мозга, можно заключить, что применение двух разных методов позволило из больших полушарий мозга животного выделить и охарактеризовать две индивидуальные формы внутриклеточной Ca^{2+} -зависимой фосфолипазы A_2 —низкомолекулярную (с M_r 14 кД) и высокомолекулярную (с M_r 100 кД). Наличие их оказалось правомерным и для растворимой фракции тромбоцитов кролика [11], где они значатся как гепаринсвязывающая и гепариннесвязывающая формы. Первая из них расположена внутри секреторных гранул в растворимом или мембраносвязанном виде. При обработке тромбоцитов активатором первая форма с M_r 14 кД высвобождается внеклеточно и не оказывает предпочтения субстрату с арахидонильным остатком. Вторая же с M_r 88 кД находится в цитоплазматической фракции тромбоцитов и гидролизует субстрат с арахидонильным остатком намного лучше, чем с линоленильным. Предполагается существование обеих форм фосфолипазы A_2 и в человеческих тромбоцитах [12].

Высокомолекулярная фосфолипаза A_2 из почек крысы, активируемая при физиологических концентрациях Ca^{2+} , при ДДС- Na электрофорезе фракционируется на две белковые полосы, соответствующие M_r 110 и 55 кД [3]. Белок с M_r 110 кД подобно фосфолипазам A_2 секреторных клеток, проявлял высокую степень У.А. и при колоночной гель-фильтрации мигрировал как гидрофобный белок. Второй же после отмывки с электрофоретических пластинок не содержал ферментативной активности в присутствии Ca^{2+} , что позволило авторам высказать предположение о дисульфид-изомеразной природе этого белка. Эти сведения дополняют ранее опубликованные данные о наличии в почке крысы наряду с фосфолипазой A_2 с M_r 14 кД и другой разновидности этого фермента, которая при гель-фильтрации проявляет себя как белок с M_r 60 кД, а при ДДС- Na электрофорезе выявляет полосу белка с M_r 110 кД [13].

Противоположная информация сообщена в работе Leslie и соавт. [14] по выделению фермента из клеток макрофага, аномально мигрирующего по колонке при гель-фильтрации, а при последующем ПААГ электрофорезе с ДДС- Na дающего основную полосу при M_r 55 кД и менее выраженную при 110 кД. Не проводя отмывки белков с геля, авторы предположительно связывают именно полосу с величиной M_r 55 кД с фосфолипазой A_2 активностью. Фосфолипаза A_2 из макрофагов мышей также является растворимой, Ca^{2+} -зависимой и высокомолекулярной, проявляющей при гель-фильтрации одинаковую с ферментом из почек крысы молекулярную массу [15]. Этого

нельзя сказать в отношении растворимой фосфолипазы A_2 тромбоцитов овцы со сходной Ca^{2+} -зависимостью при ДДС-Na электрофорезе, но выявляющей лишь полосу белка с величиной M_r 30 кД [16].

Выделенная из почек крысы высокомолекулярная фосфолипаза с M_r 110 кД, как показано, ассоциируется с микросомными мембранами Ca^{2+} -зависимым способом [13]. Полагают, что наряду с активацией фермента, гормонально регулируемое повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} может способствовать транслокации фермента и его ассоциации с мембраной. Частично очищенная цитозольная фосфолипаза A_2 с величиной M_r 100 кД из мозга крысы также ассоциируется с синантосомными мембранами Ca^{2+} -зависимым способом при 10 мкМ и 1 мМ Ca^{2+} . Эти данные однозначно подтверждают промотирующую роль Ca^{2+} в транслокации цитозольной высокомолекулярной фосфолипазы A_2 к мембранным фосфолипидам [4]. В литературе также имеются сообщения о Ca^{2+} -зависимой ассоциации фосфолипазы A_2 с мембранами клеток макрофага [17]. Полумаксимальная ферментативная активность проявляется в присутствии 500 нМ Ca^{2+} . Некоторые другие формы внутриклеточной фосфолипазы A_2 активируются только при субмиллимолярных концентрациях Ca^{2+} [18]. В то же время активирование фосфолипазы A_2 из мозга крысы носит двухфазный характер с первым пиком активации при 1—100 мкМ Ca^{2+} и вторым—при 10 мМ Ca^{2+} [4]. Несмотря на то, что приведенные высокие концентрации Ca^{2+} не являются физиологическими (0,1—0,3 мкМ), тем не менее предполагается, что они могут привести к начальной активации фермента, которая при дальнейшем гормонально стимулированном повышении уровня внутриклеточного Ca^{2+} , по всей вероятности, может вызывать транслокацию его к мембране, поскольку этот процесс сопровождается в условиях с относительно более высокой концентрацией Ca^{2+} (активирование при 10 мМ).

Две выделенные нами формы фосфолипазы A_2 из мозга быка с величиной M_r 14 и 100 кД проявляли оптимальную ферментативную активность при содержании 10 мМ Ca^{2+} в среде. Растворимая фосфолипаза с M_r 30 кД тромбоцитов овцы проявляет сходную с ферментом из почек с M_r 110 кД (10 мМ) Ca^{2+} -зависимость. Однако эти данные недостаточны для объяснения взаимосвязи между фосфолипазами A_2 с разной молекулярной массой при выявлении их биологических функций.

На примере внеклеточной и внутриклеточной фосфолипазы A_2 кролика показано сходство в аминокислотной последовательности белковой структуры, что частично подтверждается и в отношении аминокислотной последовательности фосфолипаз A_2 кролика и крысы также из фермента тромбоцитов и асцитной жидкости. Фосфолипаза A_2 , выделенная из митохондрий печени крысы, отличается от фермента из тромбоцитов только по N-концевой аминокислоте [19]. Эти данные говорят в пользу кодирования в клетках различного типа фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД родственными генами, хотя и многое остается не ясным по экспрессии генов, кодирующих ферменты с M_r 14 кД.

При хроматографии сыворотки кролика на КМ-сефадексе проявляются три разные фосфолипазные активности, что указывает либо на гетерогенность фермента, либо на возможную ассоциацию молекулы фосфолипазы A_2 с другими белками. При этом остается неразрешенным и вопрос о природе внутриклеточных факторов, способствующих экзоцитозу фосфолипаз A_2 . Гель-фильтрация надосадочной жидкости клеток почек крысы с фосфолипазной активностью, стимулированных в присутствии протеазных ингибиторов, показала отсутствие секреции фермента с M_r 60 кД (белок с M_r 110 кД при гель-фильтрации ведет себя как глобула с M_r 60 кД) и одновременно исключила возможность появления фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД в результате протеолитического расщепления (процессинга) более длинной исходной молекулярной формы фермента. Эксперименты по иммуноглобулированию контрольных и стимулированных клеток подтвердили присутствие в нестимулированных клетках фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД в большом количестве, которое еще больше возрастает в клетках и супернатанте после 8-часовой стимуляции. Последнее свидетельствует о повышении клеточной ферментативной активности исключительно благодаря синтезу ферментного белка *de novo*, но не в результате активации предшественника фосфолипазы A_2 путем транслокации фермента из цитозоля к мембране. Не исключено, что в основе действия стимуляторов лежит экспрессия гена, сопровождающаяся повышением уровня ферментного белка фосфолипазы A_2 . Истинный механизм описанного эффекта нуждается в специальном изучении, но имеются реальные предпосылки о существовании корреляции между фосфолипазной активностью с M_r 14 кД и образованием протостагландинов [20].

Клонирование соответствующего гена доказало его универсальность для транслированных форм фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД во всех клетках этих животных. Более того, была показана гомологичность структур крысы и человека [21]. Эти исследования говорят в пользу секреторной природы ферментного белка (при экзоцитозе выделяется в хромаффинных и других нейроэндокринных тканях) и что его липолитическая активность выявляется лишь вне клетки. Несмотря на ряд совпадений в свойствах фосфолипаз с M_r 14 кД, обнаружены некоторые отличия в свойствах и аминокислотной последовательности ферментного белка у крысы [19]. Указанные различия можно объяснить дальнейшей модификацией первичного продукта трансляции [21], что подтверждается фактом обнаружения у кролика трех клеточных и внеклеточных разновидностей фосфолипазы A_2 , имеющих одинаковые N-концевые аминокислотные последовательности вплоть до 16—19 остатков, рН оптимум (7,5—9), Ca^{2+} -зависимость, специфическую активность, а также сообщениями о совпадении N-концевой последовательности фосфолипаз A_2 тромбоцитов и асцитной жидкости кролика и крысы [22], синовиальной жидкости и мембраны плаценты человека.

Вышеизложенное в обобщенном виде может быть положено в

известной степени в основу концепций относительно происхождения и функционирования различных форм фосфолипазы A_2 .

Известно, что вырабатываемые в нейтрофилах липокортины (семейство противовоспалительных белков) являются потенциальными ингибиторами фосфолипазы A_2 [23—25]. Они сходны с каллиактинами—мембранными цитоскелетными белками. В литературе существуют противоречивые данные о том, ингибируют ли липокортины фосфолипазу A_2 путем прямого взаимодействия с ферментным белком или оно происходит благодаря взаимодействию фосфолипазного субстрата преимущественно ингибирующим белком, нежели с молекулой фосфолипазы. Не исключено также, что ингибирующее действие липокортинов на фосфолипазу A_2 осуществляется конкурентно к фосфолипидным субстратам. Но до сих пор не доказано, являются ли липокортины специфическими ингибиторами фосфолипазы A_2 *in vitro* и *in vivo*, поскольку их тормозящий эффект проявляется и в отношении фосфолипаз С и Д. Это основывается на исчезновении ингибирующего свойства липокортина *in vitro* при высоких значениях субстрата [24]. Отмечено, что связывание фосфолипидов липокортинами является процессом Ca^{2+} -зависимым как *in vitro*, так и *in vivo*, хотя в последнем случае оно происходит в присутствии микромолярных концентраций свободного Ca^{2+} , что, по всей вероятности, может привести к стабилизации конформации ингибитора.

Липокортины наряду с фосфолипазой A_2 присутствуют в больших количествах у животных и в бактериальных клетках, составляя около 1% клеточного белка. Они найдены также в яде змей и плазме крови. Известны липокортины с различной величиной M_r —36, 38, 68 кД (легкие, лимфоциты), 10, 42, 73 кД (плазма крови человека, крысы, кролика). Они являются как мономерными (36, 10, 42 кД), так и гетерогенными субъединичными (68, 73 кД) белками [23—25]. Полагают, что более короткие молекулярные формы липокортинов являются протеолитическими фрагментами родильных высокомолекулярных белков.

Исследование антифосфолипазной активности липокортинов, выделенных из легких свиньи и макрофагов, показывает высокую степень специфичности для различных фосфолипидов. Так, фракции с M_r 34 и 68 кД из легких ингибируют панкреатическую фосфолипазу A_2 только при использовании в качестве субстрата в первом случае фосфатидилэтаноламина, во втором—фосфатидилхолина [24].

Примечательны качественные различия фосфолипазы A_2 из других источников (панкреаса и макрофагов) к ингибированию липокортинами при использовании различных субстратов. Когда в качестве субстрата используют фосфатидилхолин, то фракция легких с величиной M_r 68 кД ингибирует только панкреатический фермент. В случае же применения фосфатидилэтаноламина как субстрата липокортин макрофага с M_r 34 кД ингибирует фосфолипазу A_2 , выделенную из макрофага, не проявляя какой-либо активности на панкреатический фермент. Эти данные позволяют предположить об

тмещем место комплексном взаимодействии, включающем специфическое связывание индивидуальных липокортинов с различными фосфолипидами, равно как и с фосфолипазой A_2 . Интересно отметить, что полное торможение активности фосфолипазы A_2 из яда щитомордника ингибитором из плазмы животного возможно лишь при предварительном ингибировании последнего с ферментом перед прибавлением к ферменту субстрата. По-видимому, в механизме описанного эффекта фигурирует пример образования прямого фермент-ингибиторного комплекса [23]. Еще одним доказательством этому служит тот факт, что при температурной обработке, триптического расщеплении отмечается полная утрата ингибирующей активности липокортинов. Имеются основания предполагать о существовании в плазме крови человека предшественника фосфолипазы A_2 , обычно низкий уровень активности которого заметно возрастает на фоне триптического гидролиза. Учитывая, однако, наличие в плазме крови человека и свиньи также ингибитора, подавляющего фосфолипазную активность, мы не исключаем вероятность участия в увеличении фосфолипазной активности в плазме фактора разрушения ингибитора. Исходя из вышесказанного, можно сделать следующие выводы.

1. Синтез фосфолипазы A_2 в клетке осуществляется в одной форме с M_r 14 кД.

2. Остальные формы фосфолипазы A_2 с большей молекулярной массой, по-видимому, являются комплексами фермента с различными липокортинами и подобными им белками в соотношении 1:1. Поскольку липокортины характеризуются неодинаковыми молекулярными массами, то и фосфолипазы A_2 , выделенные различными способами из клеток и тканей организма, также отличаются неповторяющимися молекулярными массами (55, 88, 100, 110 кД).

3. Внутриклеточные фосфолипазы A_2 , подобно секреторным ферментам, также наделены способностью к димерообразованию. Подтверждением этому служат данные электрофореза для выделенной нами фосфолипазы A_2 с M_r 100 и 14 кД, а также результаты ранее проведенных исследований [3, 14, 16].

4. К димеризации склонны не только фосфолипазы A_2 с M_r 14 кД, но и их комплексы с липокортинами и подобными белками (55 и 110 кД формы фермента). Причем, согласно различным литературным данным, димерные комплексы обладают хорошо выраженной фосфолипазной активностью в отличие от их мономерных форм.

5. Связывание фосфолипазы A_2 с растворимыми белками и липокортинами, по-видимому, приводит к образованию ряда разновидностей внутриклеточных фосфолипаз A_2 с различным проявлением биологической активности внутри клетки; во внеклеточном пространстве отмечена лишь форма фермента с M_r 14 кД.

6. Комплексообразование фосфолипаз A_2 с липокортинами и подобными им белками в целом сохраняет основные свойства фермента с M_r 14 кД.

7. Присоединение Ca^{2+} к различным растворимым формам внут-

рикеточной фосфолипазы A_2 и ее комплексам приводит к конформационным изменениям фермента, и его комплексов, влияя их физико-химические свойства; гидрофильность на гидрофобность, что, вероятно, облегчает транслокацию фермента и его комплексов от цитозоля к мембране клетки для связывания с фосфолипидами с целью их дальнейшего гидролиза на границе раздела фаз.

В заключение следует отметить, что образование различных комплексов фосфолипазы A_2 с липокартинами и им подобными белками, по всей вероятности, и обеспечивает возможность появления широкого спектра разнообразных форм внутриклеточных фосфолипаз A_2 , каждая из которых может выполнять определенную функцию, регулируемую различными сигнальными системами.

A HIGH-MOLECULAR-MASS PHOSPHOLIPASE A_2 FROM THE CATTLE BRAIN. PURIFICATION AND SOME PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES

AYANIAN A. Y.

H. C. Burettan Institute of Biochemistry, Acad. of Sci. Armenia
Yerevan

The cattle brain contains a soluble high-molecular-mass form of phospholipase A_2 . The method of isolation and purification for high-molecular-mass enzyme has been developed, including gel-filtration, hydrophobic, ion exchange and affinity column sequential chromatographies. The purified phospholipase A_2 was a 100 kDa polypeptide according to gel-electrophoresis in the presence of 0,1% Na-dodecyl sulfate and absolutely required Ca^{2+} ions for the activity. The *in vitro* optimal activity of the enzyme was observed at pH 8.5 in the presence of 10 mM Ca^{2+} ions. It was detected that the high-molecular-mass enzyme hydrolyzed phospholipids with arachidonoyl residues at the sn-2-position were more effective to study the phospholipase A_2 activity than phospholipid with palmitoyl residues.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Samuelson B., Goldyne M., Braustrom E., Hamberg M., Hammarstrom S., Malmsten C. Ann. Res. Biochem., v. 47, p. 997—1029, 1978.
2. Dennis E. A. Adv. in Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Research (ed. B. Samuelsson), New York, Raven Press Ltd., v. 20, p. 217—221, 1990.
3. Gronich J. H., Boncentre J. V., Nemenoff R. A. Biochem. J., v. 271, № 1, p. 37—43, 1990.
4. Yoshihara Y., Wa'anabe Y. Biochem & Biophys. Res. Commun., v. 17, № 2, p. 484—490, 1990.
5. Айянян А. Е. Нейрохимия, т. 9, № 1, с. 105—108, 1990.
6. Евстратова Н. Г., Айянян А. Е., Серебренникова Г. А., Евстигнеева Р. П. Биохимия, т. 47, вып. 2, с. 1547—1552, 1982.
7. Salach J. I., Turini P., Seng R., Hauber J., Singer T. P. J. Biol. Chem., v. 246, № 2, p. 331—339, 1971.

8. *Laemmli U. K.* Nature, v. 227, № 5259, p. 680—685, 1970.
9. *Reisfeld R. A., Lewis U. J., Williams D.* Nature, v. 195, № 4838, p. 231—233., 1962.
10. *Garay W. R.*—In: Methods in Enzymol., Acad. Press, New-York—London, v. 11 p. 139—151, 1967.
11. *Kim D. K., Kudo I., Fugimori Y., Mizushima H., Masuda M., Kikuchi R., Ikizawa K., Inoue K.* Biochem. & Biophys. Res. Commun., v. 15, № 2, p. 488—493, 1988.
12. *Kramer R. M., Hession C., Johansen B., Hayes G., Meharg F., Chow E. P., Tizard R., Pepinsky B. J.* Biol. Chem., v. 264, № 10, p. 5716—5775, 1989.
13. *Gronich J. H., Bonventre J. V., Nemeroff R. A.* J. Biol. Chem., v. 263, № 32, p. 16645—16651, 1988.
14. *Leslie C. C., Voetker D. R., Channon J. Y., Wall M. M., Zelarney P. T.* Biochem & Biophys. Acta, v. 963, № 3, p. 476—492, 1988.
15. *Wijkander J., Sundler R.* FEBS Lett., v. 244, № 1, p. 51—55, 1989.
16. *Loeb L. A., Gross R. W. J.* Biol. Chem., v. 261, № 25, p. 10437—10467, 1986.
17. *Channon J. Y., Leslie C. C.* J. Biol. Chem., v. 265, p. 5409—5415, 1990.
18. *Ulevitch R. J., Watanabe Y., Sano M., Lister M. D., Deems R. A., Dennis E. A.* J. Biol. Chem., v. 263, № 7, p. 3079—3085, 1988.
19. *Aarsman A. J., De Jong J. G. N., Arnoldussen E., Neyes F. W., van Wazsenaar P. D., van den Bosch H.* J. Biol. Chem., v. 264, № 17, p. 10903—10914, 1989.
20. *Schalkewijk C., Pfeilschifter J., Marki F., van den Bosch H.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 174, № 1, p. 268—275, 1991.
21. *Komada M., Kudo I., Inoue K.* Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 168, № 3, p. 1059—1055, 1990.
22. *Mizushima H., Kudo I., Horigome K., Murakami M., Hayakawa M., Kim D. K., Kohno E., Tomita M., Inoue K. I.* Biochem., v. 105, № 4, p. 520—525, 1989.
23. *Miwa M., Kubota I., Ichihashi T., Motojima H., Matsamoto M. F.* J. Biochem., v. 96, № 3, p. 761—773, 1984.
24. *Davidson F. F., Dennis E. E., Powell M., Glenney J. R. J.* Biol. Chem., v. 262, № 4, p. 1638—1705, 1987.
25. *Weber G., Ferber E.* Biol. Chem. Hoppe-Seyler, v. 371, p. 725—731, 1990.

Поступила 26. VI. 1991.

УДК 577.125+577.152.314:577.151.042

ПРОЦЕССЫ ДЕАЦИЛИРОВАНИЯ МЕМБРАННЫХ
ФОСФОЛИПИДОВ ПРИ ИНИЦИАЦИИ
ФОСФОИНОЗИТИДНОГО ЦИКЛА В СИНАПТОСОМАХ КРЫС
И ЛИМФОЦИТАХ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

ТАДЕВОСЯН Ю. В., АСАТРЯН Л. Ю., КАРАГЕЗЯН К. Г.

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван

Изучены связанные с инициацией фосфоинозитидного цикла (ФИ-цикл) процессы активации фосфоинозитидспецифичной ФДЭ (ФИ-ФДЭ) и деацилирования фосфатидилхолина (ФХ) в синаптосомах коры головного мозга крыс и лимфоцитах периферической крови человека (ЛПКЧ) под действием K^+ -деполяризации и конкаваллина А (КонА) соответственно. В обоих случаях обнаружена одноступенчатая, двухфазная динамика активации ФИ-ФДЭ в течение первой минуты инициации цикла. Выявлено коррелирующее с обнаруженной активацией ФИ-ФДЭ усиление процесса(ов) деацилирования фракции ФХ клеточных мембран, специфичное по отношению к ее жирнокислотному составу.

Ключевым звеном в функционировании ФИ-цикла — каскадного механизма, преобразующего внешние сигналы во внутриклеточные, является активация ФИ-ФДЭ, расщепляющей полифосфоинозитиды, преимущественно фосфатидилинозит-4,5-дифосфат (ФИ-4, 5-Ф₂), с образованием внутриклеточных вторичных посредников. Таковыми являются инозит-1,4,5-трифосфат (ИФ₃) и 1,2-диацилглицерин (ДАГ), вызывающие соответственно высвобождение внутриклеточного запасного кальция [1] и активацию протеникиназы С [2]. Образовавшийся ДАГ либо включается в процесс биосинтеза ФИ-4,5-Ф₂, либо подвергается поэтапному гидролизу с помощью ДАГ- и моноглицерид (МГ) липаз с образованием свободных жирных кислот (ЖК), в том числе и арахидоновой (АК), используемой для синтеза эйкозаноидов.

В настоящее время еще не полностью раскрыты молекулярные механизмы регуляции ФДЭ, активирующиеся вслед за лиганд-рецепторным взаимодействием или при воздействии на клетку различных внешних сигналов. В литературе [3] обсуждается участие регуляторных GTP-связывающих белков в процессах активации ФДЭ, однако, на наш взгляд, еще не совсем ясна природа передачи сигнала от рецептора к отмеченному усилительному ферменту через липидное микроокружение всех белковых молекул, участвующих в быстром этапе транслокации внешнего сигнала через ФИ-цикл.

Имеющиеся литературные данные [4, 5] позволяют предположить существование тесной взаимосвязи между локализацией, количественными изменениями отдельных фракций мембранных фосфолипидов (ФЛ), продуктами их гидролиза и процессами как передачи первичного сигнала через плазматическую мембрану (ПМ) клеток, так и формирования различных клеточных ответов. Отмеченные процессы должны осуществляться путем быстрых, обратимых и взаимосвязанных изменений активности широкого спектра ферментных систем обмена ФЛ, находящейся под регулирующим влиянием образующихся метаболитов, по принципу отрицательной обратной связи.

Целью настоящего исследования было изучение возможной кооперативной взаимосвязи между активацией ФИ-ФДЭ и процессами деацелирования мембранных ФХ синапсом коры головного мозга крыс и ЛПЧК при инициации ФИ-цикла K^+ -деполяризацией и митогенным лектином КоА соответственно. В течение нервов 60 с после действия внешних сигналов были изучены сдвиги в липидном метаболизме ПМ выщелоченных интактных клеточных популяций со встроенными в их мембраны меченными ФИ и ФХ в качестве эндогенных субстратов указанных ферментных систем.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на синапсом, выделенных по методу Hajos [6] из коры головного мозга белых беспородных крыс и ЛПЧК, полученных общепринятым методом [7] из крови здоровых доноров. Были использованы липидные стандарты и среды RPMI, Игла («Sigma» США), ионообменная смола Dowex IX8, HCOO⁻ форма, 200—400 меш («Serva», ФРГ), все радиоактивные соединения [$1-^{14}C$]АК (специфическая активность 56,6 мКи/ммоль), [$1-^{14}C$]олеоил-КоА (сп. актив. 52 мКи/ммоль), [$2-^3H$]инозит (сп. актив. 22,8 Ки/ммоль) фирмы «Amersham International, ple», (Англия).

Предварительное мечение клеток по 1 мКи [$1-^{14}C$]АК и [$1-^{14}C$]олеиновой кислоты (ОК) осуществляли известными методами [8, 9] в 5 мл 0,32 М сахараза—0,05 М трис-HCl буфера и среды Игла для инкубации синапсом и ЛПЧК соответственно. После инкубации в течение 1 ч при 37° суспензию клеток промывали 3 раза 15 мл забуференного раствора альбумина, свободного от ЖК (2 мг/мл).

Предварительное мечение ЛПЧК, суспендированных в среде RPMI 1640 (рН 7,4), с 20 мКи [$2-^3H$]инозита проводили в атмосфере O_2-CO_2 (95:5) в течение 3 ч при 37° с последующей 3-кратной промывкой средой инкубации, содержащей 5 мМ меченого инозита. Для установления метаболического равновесия и утилизации остатков невключенных меток разбавленные в соответствующих средах суспензии синапсом (1,5—2,0 мг белка/мл) и ЛПЧК (10^5 — 10^6 клеток/мл) проинкубировали в течение дополнительных 15—20 мин. Интактность клеток, определяемая окрашиванием трипановым синим, как правило, составляла более 90%.

Инициацию ФИ-цикла меченых синапсом проводили в вышеотмеченном 0,32 М сахараза—0,05 М трис-НСI буфере, содержащем 120 мМ К⁺, 3 мМ Na⁺, 2,5 мМ Са²⁺ и 150—200 мкг белка в конечном объеме 0,5 мл. Параллельно инкубировали контрольные пробы белка в той же буферной системе, содержащей 3 мМ К⁺, 120 мМ Na⁺ и по 5 мМ ЭГТА и ЭДТА. В таком же объеме среды Игла или RPMI осуществляли активацию ЛПЧК КоиА (2 мкг/мл).

На 0, 5, 10, 30 и 60 с после инициации цикла проводили экстракцию нейтральных липидов (НЛ) по Dole [10] и ФЛ по Bligh и Дугг [11], с дальнейшим их фракционированием методом ТСХ на фирменных («Merk», ФРГ) или приготовленных нами на основе силикагеля типа «Н» («Sigma», США) пластинках. Хроматографию НЛ проводили в системе растворителей петролейный эфир—диэтиловый эфир—муравьиная кислота (30:20:1), а ФЛ—в системах хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода (25:15:4:2) или хлороформ-ацетон-метанол-уксусная кислота-вода (6:8:2:2:1). Фракционирование инозитфосфатов (ИФ) из водной фазы, полученной после экстракции липидов, проводили по Berridge [12]. Распределение радиоактивности в идентифицированных фракциях липидов определяли с помощью радиосканирующей установки («Berthold», ФРГ). Степень радиоактивности как отмеченных липидных фракций, так и элюатов, содержащих ИФ, измеряли в жидкости Брея на сцинтилляционном спектрометре («Roche-Bioelectronique», модель SL-4221, Франция). Статистическую обработку данных производили по Стьюденту.

Результаты и обсуждение

Трехкратная промывка суспензии предварительно меченных клеток забуференным альбумином не приводила к существенной потере радиоактивности, что свидетельствует о включении синтезированных меченых ФЛ в ПМ и находится в соответствии с существующими литературными данными [8]. Около 70% радиоактивности АК, включенной в общие ФЛ синапсом, было обнаружено (рис. 1, а) в двацильных формах фракций ФИ или ФХ в зависимости от наличия в инкубационной среде экзогенно добавленных 1-ацил-лизо-ФИ и 1-ацил-лизо-ФХ соответственно. Если при включении АК в ФИ синапсом наличие радиоактивности в остальных фракциях ФЛ практически не обнаруживалось, то при осуществлении аналогичной процедуры в отношении ФХ наблюдалось параллельное, примерно 10%-ное (от общей радиоактивности), включение метки во фракцию ФИ. Это происходит вследствие либо более быстрой обменяемости последних, либо в результате более вероятного присутствия в интактных синапсомах небольшого количества одного из эндогенных акцепторов АК-лизо-ФИ. Подобная закономерность избирательной, регулируемой модификации ЖК состава различных ФЛ фракций ПМ была обнаружена нами и в тимocyтах крыс. В отличие от указанных клеточных популяций, ЛПЧК обнаруживают более стабильный

метаболический статус липидного компонента ПМ в отношении включения и процентного распределения [^{14}C]ЖК. Было выявлено преимущественное включение исследованных ЖК во фракцию ФХ, независимо от наличия в инкубационной среде различных липопродуцирующих мембранных ФЛ (рис. 1, б). Следовательно, в зависимости

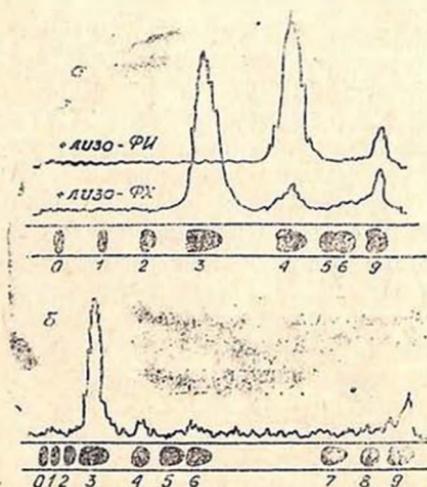
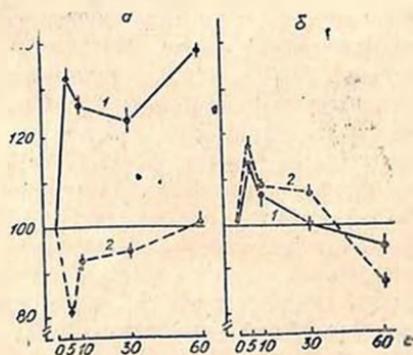


Рис. 1. Сканиграммы ТСХ полос фракционированных в системах растворителей: хлороформ-метанол-уксусная кислота-вода (25:15:4:2) (а) и хлороформ-ацетон-метанол-уксусная кислота-вода (6:8:2:2:1) (б) [^{14}C]-АК-меченных ФЛ синапсом и ЛПКЧ, соответственно. На схемах хроматограмм ФЛ фракции расположены в следующей последовательности: 0—старт, 1—лизо-ФХ, 2—сфингомиелин, 3—ФХ, 4—ФИ, 5—фосфатидилсерин, 6—фосфатидилэтаноламин, 7—фосфатидные кислоты, 8—дифосфатидилглицерин, 9—фронт

от функциональной активности и степени дифференциации, отдельные клеточные популяции характеризуются различной степенью чувствительности липидного бислоя к воздействию внешних модифицирующих факторов.

Рис. 2. Динамика изменения количества 1,2-ДАГ и свободной АК в условиях K^+ -деполяризации синапсом мозга крыс, содержащих 1-ацил-2- [^{14}C]-арахидонил-ФИ (а) и 1-ацил-2- [^{14}C]-арахидонил-ФХ (б). 1—1,2-ДАГ, 2—АК. Здесь и на рис. 3—6 за 100% приняты исходные уровни радиоактивности исследованных метаболитов в отсутствие активирующего внешнего сигнала



Изучение процесса инициации ФИ-цикла в синапсомемах, меченных 1-ацил-2- [^{14}C]-арахидонил-фосфоинозитидами, в условиях калиевой деполяризации выявило (рис. 2, а) 2-фазную динамику активации ФИ-ФДЭ с более чем 30%-ным (от исходного содержания) повышением уровня ДАГ уже на 5-й с активации клеток с последующим спадом до 30-й с и вторичным накоплением на 60-й с.

Обнаруженные сдвиги в содержании ДАГ—продукта диэстеразного расщепления АК-содержащих фосфоинозитидов коррелировали с понижением уровня свободной АК, что свидетельствовало о доминировании (особенно на 5-ой с активации цикла) процессов утилизации этой кислоты над ее высвобождением из фракций ФИ.

Исследование связанных с инициацией ФИ-цикла вышеотмеченных катаболических процессов в идентичных условиях эксперимента с использованием синапсом со встроенными в их мембраны 1-ацил-2-[1-¹⁴C]-арахидонил-ФХ позволило выявить через 5 с после действия внешнего сигнала почти 20%-ное повышение количества свободной АК (рис. 2, б) с последующим ее спадом до уровня нижеисходного (60 с). Примечательно, что динамика изменения количества АК до 30 с наблюдения четко коррелировала с динамикой активации ФИ-ФДЭ. Обнаруженное при этом некоторое увеличение уровня ДАГ, на наш взгляд, можно объяснить как следствие активации ФИ-ФДЭ, действующей на ФИ, включившие отмеченную выше 10%-ную радиоактивность АК.

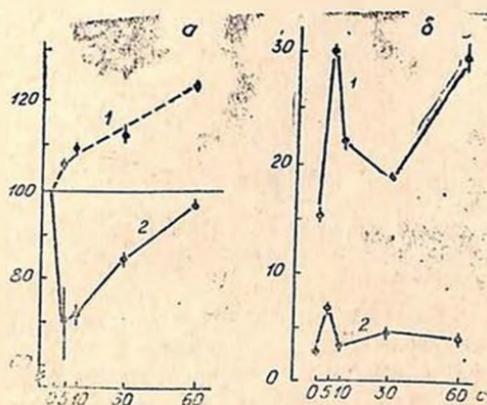


Рис. 3. а. Сдвиги в содержании [1-¹⁴C]-ОК и [1-¹⁴C]-олеоил-ДАГ в динамике К⁺-деполяризации синапсом, содержащих [1-¹⁴C]-олеоил-ФХ; 1—ОК, 2—1,2-ДАГ б. Изменения в содержании 1,2-ДАГ и 2-МГ в [1-¹⁴C]-арахидонатмеченных ЛПК в течение 60 с после инициации ФИ-цикла митогенным лектином КонА; 1—1,2-ДАГ, 2—2-МГ.

Полученные экспериментальные данные по исследованию действия калиевой деполяризации на синапсомы, меченные 1-ацил-2-[1-¹⁴C]олеоил-ФХ в отсутствие радиоактивности во фракциях ФИ также свидетельствуют об активации процесса(ов) деацилирования ФХ с одновременным подавлением выхода [1-¹⁴C]олеоил-ДАГ (рис. 2, а). Примечателен факт несоответствия динамики высвобождения меченой ОК с таковой для АК в идентичных условиях эксперимента, указывающий на наличие в ПМ синапсом метаболически различных (по ЖК составу) пулов фракции ФХ, специфически деацилирующихся при инициации активности ФИ-ФДЭ.

Обнаружение различными исследовательскими группами большого числа клеточных популяций [1, 13, 14], активирующихся через ФИ-цикл, а также выявленные нами закономерности активации ФИ-ФДЭ и процессов деацилирования ФХ в отсутствие лиганд-рецепторного взаимодействия, послужили основанием для проведения серии

исследований по изучению особенностей протекания отмеченных процессов, по своим морфо-функциональным характеристикам отличающихся от синапсом, ЛПЧК под действием митогенного лектина КонА. Установлено, что последний является специфическим агонистом цитотоксической Т-клеточной популяции ЛПЧК.

Под действием митогенной концентрации КонА в $[1-^{14}\text{C}]$ АК-меченных ЛПЧК наблюдалось (рис. 3, б) увеличение содержания ДАГ с максимумами на 5- и 60-й с инициации ФИ-цикла, свидетельствующее об активации ФИ-ФДЭ. Некоторое повышение при этом уровня $[^{14}\text{C}]$ арахидонил-МГ только на 5-й с после действия КонА в отсутствие (рис. 5, а) распада триглицеридов (ТГ) может быть следствием активации ДАГ-липазного пути высвобождения АК.

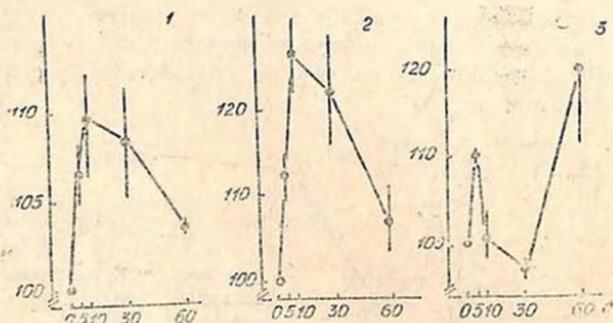


Рис. 4. Динамика КонА-индуцированной активации ФИ-ФДЭ в $[\text{I}^3\text{H}]$ -инозитмеченных ЛПЧК. 1—инозитмонофосфат, 2—инозитдифосфат, 3—инозиттрифосфат

Наличие в ПМ клеток различных ферментативных механизмов образования и дальнейших метаболических превращений ДАГ делает необходимым проведение дополнительных исследований в вышеотмеченном плане с использованием $[\text{I}^3\text{H}]$ инозитмеченных клеток для более прямой и корректной оценки активности ФИ—ФДЭ. Повышение уровней $[\text{I}^3\text{H}]$ инозитмоно- (ИФ₁), дифосфатов (ИФ₂) и ИФ₃ в ЛПЧК с первых секунд инициации ФИ-цикла указывает на активацию диэстеразы, первичным субстратом которой является ФИ-4,5-Ф₂ (рис. 4). Об этом свидетельствует идентичность динамики изменения количества ИФ₃, второго продукта диэстеразного гидролиза отмеченной фракции фосфоинозитидов, с таковой, обнаруженной ранее для $[\text{I}^{14}\text{C}]$ -ДАГ. Подобная закономерность в корреляции динамик высвобождения ИФ₃ и распада ФИ-4,5-Ф₂ под действием КонА была обнаружена и в $[\text{I}^3\text{H}]$ -инозитмеченных тимocyтах крыс в идентичных условиях эксперимента (неопубликованные данные).

Согласно немногочисленным литературным данным [15, 16], увеличение количества внутриклеточного Ca^{2+} вследствие инициации ФИ-пути передачи внешних сигналов начинается после 1-ой с акти-

важни клеток и достигаєт максимума через 6—8 с. При этом, если образование ИФ₂ происходит без какого-либо лаг периода, то кальциевый ответ отстает от последнего, по крайней мере, на 1 с [16]. В дальнейшем включаются механизмы входа в клетку внешнего Са²⁺ через специализированные каналы.

Сопоставление данных проведенных нами исследований с литературными позволяет утверждать о двухфазной динамике активации ФИ-ФДЭ в течение 60 с инициации ФИ-цикла, независимо от типа клеток (синапсомы, ЛПКЧ, тимоциты) и первичного сигнала (К⁺-деполяризация, КоА). Можно заключить, что обнаруженная нами первичная активация ФДЭ на 5-й с инициации ФИ-цикла осуществляется только мембраносвязанным каскадным механизмом, тогда как в последующую, вторичную фазу активации фермента могут быть вовлечены различные внутриклеточные Са²⁺-зависимые процессы.

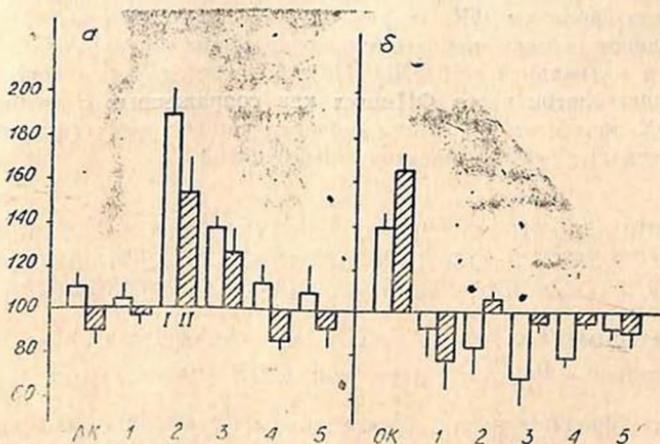


Рис. 5. Сдвиги в содержании НЛ, ЛПКЧ, премеченных (а) [1-¹⁴C]-АК и (б) [1-¹⁴C]-ОК на 5 сек после действия КоА в среде Игла без (I) и с добавлением (II) 5 мМ Са²⁺; 1—МГ, 2—1,2—ДАГ, 3—1,3—ДАГ, 4—триглицериды, 5—эфирь холестерина

Имеются указания [8] относительно активирующего действия ДОХ-На на синапсомную мембраносвязанную ФИ-ФДЭ. Подобное влияние на ее растворимую форму в головном мозгу крыс оказывают [17] ненасыщенные ЖК (АК и ОК), наряду с лизо-ФЛ, обладающими детергентоподобными свойствами. Предполагается также, что клеточная ФИ-ФДЭ ассоциирована со специфическим липидным микроокружением [18], чем и объясняется [19] выраженное ингибирующее действие холинсодержащих ФЛ, в частности ФХ, на ее активность.

Исследование изменений количества отдельных фракций НЛ в ЛПКЧ на 5-й с инициации ФИ-цикла под действием КоА показало

доминирование процессов катаболизма $[1-^{14}\text{C}]$ -ЛК и $[1-^{14}\text{C}]$ -ОК-меченных ФЛ по диэстеразному и деацетиловому путям соответственно (рис. 5, а, б). Если добавление в инкубационную среду Игла 5 мМ Ca^{2+} приводило к достоверной активации процесса(ов) деацелирования $[1-^{14}\text{C}]$ -ОК-модифицированных ФЛ с увеличением выхода свободной ОК, то диэстеразное расщепление $[1-^{14}\text{C}]$ -ЛК-модифицированных ФЛ претерпевало обратное изменение. Полученные данные свидетельствуют, что начальная, мембраносвязанная фаза активации ФИ-ФДЭ (5 с) и в синантосомах мозга крыс и в ЛПФЧ сопряжена с активацией процессов деацелирования ФХ, преимущественно локализованной во внешнем монослое липидного бислоя клеточных мембран фракции ФЛ.

Таким образом, полученные нами данные позволяют утверждать, что обнаруженная нами быстрая активация Ca^{2+} -зависимых, специфичных по отношению к ЖК составу субстрата реакций деацелирования фракции ФХ, может служить промежуточным регуляторным звеном между процессами воздействия на клетки внешних сигналов и активацией ФИ-ФДЭ. Не исключается также вовлечение в активацию клеток через ФИ-цикл как сопряженных с деацелированием ФХ процессов их рециклирования, так и других фракций ФЛ путем различных метаболических превращений.

MEMBRANE PHOSPHOLIPID DEACYLATION PROCESSES ASSOCIATED WITH PHOSPHOINOSITIDE CYCLE INITIATION IN RAT SYNAPTOSOMES AND HUMAN BLOOD LYMPHOCYTES

TADEVOSIAN Yu. V., ASATRIAN L. Yu., KARAGEUZYAN K. G.

Institute of Molecular Biology, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

Phosphoinositide-specific phosphodiesterase activation and phosphatidylcholine deacylation, associated with phosphoinositide cycle initiation by K^{+} --depolarization and concanavalin A accordingly in rat cerebral cortex synaptosomes and human blood lymphocytes were investigated. Both cells observed similar, biphasic activation of dynamics for phosphoinositide-specific phosphodiesterase during the first minute of the cycle initiation. Phosphatidylcholines fatty acid composition--dependent, specific stimulation of deacylation process(es), correlating with observed phosphodiesterase activation, was shown.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Berridge M. J., Irvine R. F. *Nature*, v. 312, № 5922, p. 315-321, 1984.
2. Nishizuka Y. *Nature*, v. 308, № 5961, p. 693-698, 1984.
3. Gilman A. C. *Cell*, v. 35, p. 577-579, 1984.
4. Hirata F., Axelrod J., Crews F. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 76, p. 4813-4816, 1979.

5. Hofmann S. L., Majerus P. W. *J. Biol. Chem.*, v. 257, № 23, p. 14359—14364, 1982.
6. Hajos F. *Brain Res.*, v. 93, № 2, p. 485—489, 1975.
7. Innes J., Runtz M. M., Kin Y. T., Weckster M. E. *J. Clin. Invest.*, v. 64, № 6, p. 1608—1613, 1979.
8. Manning R., Sun G. Y. *J. Neurochem.*, v. 41, № 6, p. 1735—1743, 1983.
9. Corbin D. R., Sun G. Y. *J. Neurochem.*, v. 30, № 1, p. 77—82, 1978.
10. Dole V. P. *J. Clin. Invest.*, v. 35, № 1, p. 150—159, 1955.
11. Bligh E. G., Dyer W. J. *Canad. J. Biochem. Physiol.*, v. 37, № 8, p. 911—917, 1959.
12. Berridge M. J., Dawson R. M. C., Downes C. P., Heslop J. P., Irvine R. F. *Biochem. J.*, v. 212, № 3, p. 473—482, 1983.
13. Hagesawa-Sasaki H. *Biochem. J.*, v. 232, p. 95—100, 1985.
14. King S. L. *Immunology*, v. 65, p. 1—7, 1988.
15. Drummond A. H. *J. Exp. Biol.*, v. 124, p. 337—353, 1986.
16. Berridge M. J. *Biochem. J.*, v. 212, p. 849—856, 1983.
17. Irvine R. F., Letcher A. J., Dawson R. M. C. *Biochem. J.*, v. 178, № 2, p. 497—500, 1979.
18. Lenstra P., Mauco G., Chap H., Doust-Blazy L. *Biochim. et biophys. acta*, v. 792, № 2, p. 199—205, 1984.
19. Irvine R. F., Dawson R. M. C. *Biochem. Sci. Trans.*, v. 8, № 1, p. 27—30, 1980.

Поступила 16. III. 1992

СОДЕРЖАНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КЛАССОВ РНК
В ГОЛОВНОМ МОЗГУ ПРИ ДЕЙСТВИИ
ПИРАЗОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙХАЧАТРЯН Г. С., АДАМЯН М. Х., АНТОНЯН А. А.,
КАЗАРЯН А. Р., САЯДЯН К. С.

Ереванский государственный медицинский институт

Изучено действие пиразоловых соединений из группы ингибиторов нитрификации на активность генетического аппарата нервных клеток высших животных. Показано усиление биосинтеза я-РНК АУ (более чем в 2 раза) и GC типов, р-РНК и т-РНК в клетках головного мозга при действии метилпиразола и карбамоилметилпиразола в острых экспериментах (1—3 дня). В подострых экспериментах (1—3 месяца) действие пиразоловых соединений в отношении нуклеинового обмена, за исключением я-РНК АУ типа, имеет противоположную направленность. С увеличением содержания я-РНК АУ типа наступает подавление синтеза я-РНК GC типа (предшественник р-РНК), р-РНК и т-РНК, что свидетельствует о преимущественном поражении ядрышкового аппарата нервных клеток, ответственных за биосинтез указанных форм РНК. В механизме действия указанных соединений первый лот (N1) пиразола рассматривается в качестве активного центра, реализующего их действие на нуклеиновый обмен клеток мозга.

Интенсивное применение синтетических химических соединений и других ксенобиотиков нередко сопровождается ухудшением экологического состояния и ростом нейро-психических и других заболеваний. Конкурируя с природными индукторами и ингибиторами генной активности, ксенобиотики могут вызвать специфические и неспецифические реакции интоксикации, нарушающие процессы репликации, транскрипции и трансляции и в результате повреждения или мутации структур генетического материала привести к нежелательным последствиям в результате нейротоксического действия. В связи с отмеченным представляет исключительный интерес выявление механизма влияния различных ксенобиотиков на генную активность, а также выяснение вопроса реальности существования специфических рецепторов для связывания ксенобиотиков при генной экспрессии и разыгрывании процессов интоксикации и мутации. Эти и другие задачи по сей день остаются недостаточно освещенными [1—6]. Изучение путей нейротоксического действия многих ксенобиотиков с учетом особенностей функционирования генома нервных клеток представляет одну из интересных и важнейших направлений молекулярной биологии.

Настоящая работа является фрагментом наших исследований молекулярно-биологического и нейрохимического профиля, посвященных изучению особенностей действия ксенобиотиков в плане исследования в клетках головного мозга эффектов пиразоловых соединений (3-метилпиразол, 1-карбамоил-3/5-метилпиразол, ингибиторы нитрификации), на количественную характеристику ядерных РНК AU (предшественник информационной РНК) и GC (предшественник рибосомной РНК) типов, р-РНК и т-РНК.

Материалы и методы

Эксперименты проводили в остром опыте на белых крысах-самцах массой 150—200 г. Метилпиразол (МП) и карбамоилметилпиразол (КМП) вводили перорально в концентрациях 1:3, 1:5, 1:10 ЛД₅₀ в течение 3-х дней по одному разу. Смертельная доза (ЛД) применяемых препаратов составила 3840 мг/кг. В подострых экспериментах применяли 1:50, 1:100, 1:1000 ЛД₅₀ препаратов в течение 1 и 3 месяцев (ежедневный однократный прием).

Выделение, очистку и количественное определение различных классов РНК клеток головного мозга проводили разработанным нами комбинированным методом фенольной экстракции, дифференциального ультрацентрифугирования, гель-фильтрации с последующей ультрафиолетовой спектроскопией полученных РНК и идентификацией последней со стандартным образцом РНК («Sigma», США) [7--9]. В итоге в чистом виде были получены и изучены типы ядерных РНК GC и AU, а также р-РНК и т-РНК. Количество РНК выражали в мкг/г мозговой ткани.

Использовали ультрацентрифугу Spinco (модель L-2-65K), фракционный коллектор (модель Müfem), спектрофотометр VSU 2-P, стандартные препараты т-РНК, р-РНК, т-РНК («Sigma», США). Все эксперименты выполняли в холодильной комнате при 2°.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования по изучению действия МП на количественную характеристику различных классов РНК в клетках мозга в острых и подострых экспериментах приведены в табл. 1, согласно которой в клетках головного мозга содержание я-РНК AU и GC типов, р-РНК и т-РНК в контрольных опытах составляет $272 \pm 0,62$, $185 \pm 0,62$, $1090 \pm 32,2$, $287 \pm 3,0$ мкг/г ткани соответственно, а количество общей РНК колеблется в пределах 1834 мкг/г.

Эффекты пиразоловых соединений сопровождаются значительными изменениями в головном мозгу количественных характеристик различных классов РНК. В острых опытах МП в концентрации 1:3 ЛД₅₀ приводит к чувствительным сдвигам в содержании почти всех изученных форм РНК, выражающимся в достоверном увеличении концентрации как ядерных, так и цитоплазматических форм РНК. Согласно нашим данным, уровень я-РНК AU типа возрастал

более чем в 2 раза, приблизительно составляя $582 \pm 6,44$ мкг/г ткани против $272 \pm 0,62$ мкг/г в контроле. На этом фоне количество р-РНК по сравнению с исходным увеличилось примерно на 1:3, составляя $1635 \pm 34,84$ мкг/г против $1090 \pm 32,2$ мкг/г; аналогичные достоверные сдвиги прослеживались и со стороны содержания я-РНК GC типа и т-РНК и общего РНК, которое по сравнению с контролем (1834 мкг/г) достигало 2818 мкг/г. Полученные результаты свидетельствуют о мощном стимулирующем влиянии МП на активность генетического аппарата. Выдвинутое нами предположение полностью подтвердилось при испытании препарата в концентрации 1:5 и 1:10 ЛД₅₀. Из приведенных в таблице данных видно, что под действием указанной дозы содержание изученных нами форм РНК в мозгу еще больше возрастало для я-РНК GC и AU типов, р-РНК и т-РНК соответственно, содержание же общей РНК в тех же условиях эксперимента возрастало на 78%, количество я-РНК AU типа—более чем в 3 раза, т-РНК—почти в 2 раза. Применение МП в концентрации 1:10 ЛД₅₀ характеризовалось увеличением содержания я-РНК GC и AU типов, р-РНК и т-РНК.

Как показали результаты проведенных наблюдений, все дозы МП, особенно 1:5 ЛД₅₀ обладают значительным эффектом в индукции генома нервных клеток. Установленный нами впервые в острых опытах индуцирующий эффект МП на нуклеиновый обмен имеет прямое отношение к перенапряжению функций генома и интенсивности биосинтеза белков в клетке. Таким образом, этот неконтролируемый интенсивно протекающий синтез биополимеров—РНК и белков может оказать пагубное влияние на регуляторные системы в процессе апластического роста клеток и тканей. Для окончательного обоснования выдвигаемого заключения представлялось необходимым проследить за действием МП как на нуклеиновый обмен подострых экспериментах, так и на активность ферментов метаболизма РНК—рибонуклеазу и ДНК-зависимую РНК-полимеразу.

Как вытекает из данных табл. 1, месячная затравка животных МП в концентрации 1:50 ЛД₅₀ вызывает статистически достоверное повышение содержания лишь я-РНК AU типа, являющегося предшественником информационной РНК. На этом фоне содержание других разновидностей РНК претерпевало противоположные сдвиги. Его уменьшение для я-РНК GC типа как предшественника рибосомной РНК, р-РНК и т-РНК, за редким исключением, статистически достоверно устанавливалось приблизительно в пределах $120 \pm 0,45$, $880 \pm 22,42$ и $180 \pm 0,42$ мкг/г соответственно против $185 \pm 0,65$, $1090 \pm 32,22$ и $287 \pm 0,32$ мкг/г в контроле.

Аналогичная закономерность повторялась при действии меньших концентраций препарата. Одномесячная затравка МП в концентрации 1:100 ЛД₅₀, как и при дозе 1:50 ЛД₅₀ сопровождается понижением содержания всех изученных трех форм РНК, причем количество я-РНК AU типа, достоверно увеличивается, составляя примерно $420 \pm 16,24$ мкг/г против $272 \pm 0,06$ мкг/г в контроле (табл. 1).

Таблица 1

Содержание различных классов РНК в головном мозгу
при действии метилпиразола (мкг/г)

Класс РНК	Контроль	Приемые концент. аци		
		1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀
я-РНК GC типа	185±0,62	220±0,64	240±0,74**	230±0,25**
я-РНК AU типа	272±0,62	682±0,41***	794±0,08***	702±1,83***
р-РНК	1090±32,2	1636±34,84*	1707±3,90***	1429±34,13*
т-РНК	287±3,00	3,81±6,4***	541±6,44***	350±5,15**
общая РНК	1831	2818	3282	2714

Подострые эксперименты

Класс РНК	Контроль	1/50 ЛД ₅₀	1/100 ЛД ₅₀	1/50 ЛД ₅₀	1/50 ЛД ₅₀
		1 месяц	1 месяц	3 месяца	3 месяца
я-РНК GC типа	185±0,65	120±0,15**	150±0,48**	125±0,36***	120±0,42***
я-РНК AU типа	272±0,052	440±0,72***	420±16,24***	320±2,4*	280±0,62
р-РНК	1090±32,22	880±24,42**	960±28,46**	680±12,54***	680±12,64***
т-РНК	287±0,32	180±0,42***	240±5,4**	100±0,25***	120±0,45
общая РНК	1831	1630	1770	1215	1180

Примечание. Здесь и в табл. 2: число опытов в каждом ряду—8, * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Анализ полученных результатов позволяет допустить возможность поражающего действия МП после перенапряжения функций генома в острых опытах в отношении ферментативных систем биосинтеза я-РНК GC типа, р-РНК и т-РНК в хроническом эксперименте, осуществляемого в основном с участием ядрышковой ДНК-зависимой РНК-полимеразы. На этом фоне МП по-прежнему продолжает индуцировать биосинтез предшественника информационной РНК (я-РНК AU типа), определяющего характер и специфику синтезируемого белка. Не исключена возможность негативного влияния МП на биосинтез строительных блоков РНК и на предшествующих этапах развития этого процесса, изучение которого и других важных аспектов нуклеинового обмена в деталях под действием пирозоловых соединений потребует проведения специальных исследований.

Существенный интерес представляют результаты экспериментальных исследований по месячной затравке МП, который в концентрации 1:50 ЛД₅₀ оказывает ярко выраженное подавляющее действие на синтез изученных форм РНК. Так, например, согласно нашим наблюдениям, содержание я-РНК GC типа, р-РНК и т-РНК по сравнению с контролем убывает соответственно на 32, 37 и 65%, а содержание я-РНК AU типа увеличивается на 17%. При 3-месячной затравке МП в концентрации 1:100 ЛД₅₀ содержание я-РНК GC типа, р-РНК и т-РНК по-прежнему статистически достоверно уменьшается соответственно на 37, 39 и 58%, а уровень я-РНК AU типа лишь колеблется в пределах контроля, что не исключает возможности поражения на этой стадии как ферментативной системы, синтезирующей информационную РНК, так и других регуляторных процессов синтеза азотистых оснований, нуклеотидов в цепи биосинтетических реакций РНК.

Таким образом, тенденция к повышению содержания я-РНК AU типа при действии всех испытанных нами доз МП продолжается и в подострых экспериментах, в то время как содержание трех других форм РНК (я-РНК GC типа, р-РНК и т-РНК), наоборот, уменьшается. Не исключено, что после определенного перенапряжения генома в остром периоде интоксикации подострое и хроническое воздействие препарата приводит к поражению РНК-синтезирующей системы. Полученные данные свидетельствуют о непосредственном действии на геном нервных клеток, вызывающем ненормальный рост нуклеиновых клеток в период острой интоксикации и поражение генетического аппарата, приводя таким образом к уменьшению или почти остановке синтеза нуклеиновых кислот в условиях хронической интоксикации. В обоих случаях эти явления расцениваются как весьма негативное для жизнедеятельности клеток организма. Интенсивный рост количества биополимеров (РНК, а соответственно и белков) в период острой интоксикации не исключает возможность ускорения неконтролируемых репаративных процессов в пути неопластического роста клеток, в то время как поражение

генетического аппарата при хронической интоксикации приводит к прекращению его функции головного мозга.

Для окончательного суждения о вредном влиянии пиразоловых соединений мы сочли необходимым изучить нуклеиновый обмен головного мозга и под действием их другого представителя—КМП, отличающегося от МП наличием карбамильной группы в 1-м положении азота пиразолового кольца.

Как вытекает из данных табл. 2, в острых опытах КМП в концентрации 1:3 ЛД₅₀ вызывает статистически достоверное понижение содержания я-РНК АУ типа и, наоборот, повышение количества т-РНК, составляя соответственно $200 \pm 8,42$ и $459 \pm 4,78$ мкг/г ткани против $272 \pm 0,62$ и $287 \pm 3,0$ в контроле. При этом содержание я-РНК GC типа и р-РНК, имея тенденцию к повышению, тем не менее колебалось в пределах контроля. В тех же условиях эксперимента в концентрации 1:5 ЛД₅₀ КМП вызывают значительное повышение содержания я-РНК АУ типа, р-РНК и т-РНК соответственно до $592 \pm 5,63$, $1760 \pm 39,99$ и $440 \pm 3,22$ мкг/г. Содержание я-РНК АУ типа и т-РНК увеличивается в 2,9 и 1,5 раза, р-РНК—на 61%. Содержание я-РНК GC типа также повысилось, а уровень общей РНК возрастал до 3017 мкг/г, что по сравнению с контролем составляет 64%. Сопоставление полученных результатов по действию КМП и МП при одинаковых концентрациях позволяет выявить однонаправленность в действии этих двух пиразоловых соединений с той разницей, что КМП выступает также в роли мощного индуктора активности генетического аппарата клеток головного мозга.

Примечательно, что содержание изученных форм РНК в головном мозгу значительно увеличивается и при действии сравнительно меньшей концентрации (1:10 ЛД₅₀) препарата. При этом в нервных клетках уровень я-РНК GC и АУ типов, р-РНК и т-РНК доходит до $236 \pm 0,84$, $469 \pm 3,70$, $1690 \pm 35,42$, $340 \pm 3,20$ мкг/г соответственно, а количество общей РНК доходит приблизительно до 2735 мкг/г против 1834 мкг/г в контроле. Эти сдвиги по сравнению с контролем составляют соответственно 27, 72, 61, 18 и 49%.

Анализ полученных данных показывает, что КМП в индукции генетического аппарата обладает почти теми же свойствами, что и МП.

Направленность и эффективность реакции интоксикации обоих препаратов на нуклеиновый обмен протекает однотипно, по-видимому, по одному и тому же механизму. По всей вероятности, эффект действия КМП в острых опытах проявляется после потери карбамильной группы и высвобождения N¹ в пиразоловом кольце. В пользу такого вывода свидетельствует сравнительно активное действие МП на нуклеиновый обмен при концентрации 1:3 ЛД₅₀, при котором КМП не оказывает заметных сдвигов в содержании изученных форм РНК. Более высокая концентрация последнего—1:3 ЛД₅₀, по-видимому, влияет на интенсивность течения ферментатив-

Таблица

Содержание различных классов РНК в головном мозгу
при действии карбамонметилпиразола (мкг/г)

Класс РНК	Контроль	Применяемые концентрации			
		1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀	
я-РНК GC типа	185±0,62	194±6,65	225±0,32*	236±0,84	
я-РНК AU типа	272±0,62	200±8,42	592±5,63***	439±3,70***	
р-РНК	1099±32,2	1165±32,52	1760±9,99***	1690±35,42**	
т-РНК	287±3,00	458±4,78***	440±3,32***	340±3,20**	
общая РНК	1834	2018	3017	2735	
Подопытные эксперименты					
Класс РНК	Контроль	1/50 ЛД ₅₀	1/100 ЛД ₅₀	1/50 ЛД ₅₀	1/100 ЛД ₅₀
		1 месяц	1 месяц	3 месяца	3 месяца
я-РНК GC типа	185±0,65	120±0,32***	163±0,64**	80±0,22***	130±0,42***
я-РНК AU типа	272±0,52	420±0,65***	450±0,78***	419±0,66***	476±0,62***
р-РНК	1090±32,22	889±18,46**	920±22,44*	720±16,42**	572±16,42**
т-РНК	287±0,32	240±0,36	276±0,46	250±0,24**	248±0,66
общая РНК	1834	1660	1841	1170	1220

ных реакций, которые направлены на отщепление карбамонильной группы от КМП и ее дальнейшие превращения.

Однозначность или сходство механизмов действия КМП и МП на нуклеиновый обмен головного мозга подтверждают и результаты наших исследований по изучению влияния КМП на это звено метаболизма в подострых экспериментах.

Как показывают данные табл. 2, КМП в концентрации 1:50 и 1:100 ЛД₅₀ в подострых опытах вызывает аналогичные с действием МП сдвиги в нуклеиновом обмене. Содержание я-РНК АУ типа при действии указанных концентраций препарата достоверно повышается соответственно до $420 \pm 0,65$ и $480 \pm 0,42$ мкг/г против $272 \pm 0,62$ мкг/г в контроле. Как и в хронических опытах с МП, КМП вызывает статистически достоверное понижение количества я-РНК GC типа и р-РНК соответственно до $120 \pm 0,32$, $163 \pm 0,64$, $880 \pm 18,46$ и $920 \pm 22,44$ мкг/г. Аналогичная закономерность в нуклеиновом обмене прослеживается и при действии указанных концентраций препарата, применяемых в течение 3-х месяцев, когда содержание предшественника информационной РНК, как и при однемесячной заправке, статистически достоверно возрастает, составляя $440 \pm 0,66$ и $476 \pm 0,62$ мкг/г против $272 \pm 0,62$ мкг/г в контроле, а уровень р-РНК понижается и колеблется в пределах $720 \pm 16,42$ и $872 \pm 16,42$ мкг/г против $1090 \pm 32,22$ мкг/г в контроле; аналогично изменяется и содержание общей РНК. При действии указанных концентраций КМП значительно убывает и содержание я-РНК GC типа соответственно до $80 \pm 0,22$ и $130 \pm 0,42$ мкг/г против $185 \pm 0,65$ мкг/г в контроле.

На основании анализа данных, полученных в хроническом эксперименте, можно предположить об избирательном воздействии КМП преимущественно на ядрышковый аппарат клетки, где сосредоточены ферменты биосинтеза предшественников рибосомной и транспортной РНК. Этим, по всей вероятности, и можно объяснить резкое снижение количества я-РНК GC типа, р-РНК, установленное нами в подострых экспериментах.

Таким образом, при высоком содержании информационной РНК КМП в острых экспериментах вызывает индукцию биосинтеза всех форм РНК, а в подострых—резкое уменьшение содержания я-РНК GC типа и р-РНК.

Полученные данные приводят нас к твердому убеждению, что указанные ирразоловые соединения действуют единым механизмом на функцию генетического аппарата, в начале в качестве индукторов биосинтеза РНК, вызывая ненормальный рост биополимеров, а в дальнейшем и чрезмерное напряжение функции генома в первичных клетках, что приводит к понижению РНК-синтезирующих систем в ядерном и ядрышковом аппаратах клеток. Не исключено поражающее воздействие изученных факторов в хронических экспериментах и на предшествующие этапы нуклеинового обмена, при этом уменьшается пул азотистых оснований, нуклеозидов и нуклео-

тидов, необходимых строительных блоков, вовлекающихся в реакции биосинтеза нуклеиновых кислот.

Результаты исследований по острым и подострым экспериментам с применением 1:3, 1:5 и 1:10 ЛД₅₀ (в острых) и 1:10, 1:100 ЛД₅₀ (в подострых, 1—3 месяца) препаратов МП и КМП служат основанием считать метилпиразоловую конфигурацию и в особенности первый азот (N¹) пиразолового кольца действующим началом в структуре молекулы обоих препаратов, способным индуцировать геном первичных клеток в пути биосинтеза различных классов РНК. Хотя изученные соединения выступают в роли мощных индукторов нуклеинового обмена, вызывающих одностороннее и несколько разное действие на генетический аппарат, МП оказывается более активным, а КМП осуществляет свое влияние на генетический аппарат, по-видимому, после потери карбамонильной группы и перехода в МП. Активная роль первого азота пиразолового кольца, по нашему мнению, может заключаться в приеме и отдаче различных функциональных групп, в том числе и карбамонильной группы, благодаря чему он может вовлекаться во временное взаимодействие со структурой хроматина для разделения цепей двуцепочечной ДНК и создания условий интенсификации функциональной активности реплицирующих и транскрибирующих ферментов. С другой стороны, эти препараты во времени формируют определенный фон напряжения функции генома, поражая некоторые регуляторные системы, в особенности РНК-синтезирующий аппарат. Частичный ответ на эти и другие вопросы мы получим после рассмотрения наших экспериментальных данных, посвященных изучению изменений в активности рибонуклеазы основного фермента деградирующего РНК и ДНК-зависимых РНК-полимераз, обеспечивающих биосинтез различных форм РНК в клетках.

THE CONTENT OF VARIOUS CLASSES OF BRAIN RNA UNDER THE EFFECT OF PYRAZOLE COMPOUNDS

KNACHATRIAN G. S., ADAMIAN M. KH., ANTONIAN A. A., KAZARIAN A. R., SAYADIAN K. S.

Yerevan Medical Institute, Scientific Research Institute of Toxicology

Effect of pyrazole compounds from the group of inhibitors of nitric acid at the activity of genetic apparatus of animal nerve cells was studied. An increase of biosynthesis of n-RNA of AU and GC types, r-RNA and t-RNA in the brain cells under the effect of methylpyrazole and carbamoyl methylpyrazole in acute experiments (1—3 days) was shown. The content of n-RNA of AU type (pre-m-RNA) was elevated more than two times. In nonacute experiments (1—3 months) the effect of pyrazole compounds in regard to nucleic acid metabolism despite of

n-RNA AU type had an opposite direction. With the increase of the content of n-RNA AU type there came the depression of the synthesis of n-RNA GC-type (precursor of r-RNA), r-RNA and t-RNA, which shows a primary affect of nucleotic apparatus of nerve cells, responsible for the biosynthesis of indicated forms of RNA. The first nitrogen (N) of pyrazole was considered to be an active centre of the effect of indicated compounds in the mechanism of their action at the nucleic acid metabolism of brain cells.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Hodgson E., Bent J. R., Phillips R. M. (ed), Reviews in biochemical toxicology, New York e. a. Elsevier, v. 7, № 15, p. 237, 1985.*
2. *Calzavara J., Gibson G. G., Gordon J. W., Pachs D. V. Xenobiotica, v. 16, № 10—11, p. 733—1078, 1986.*
3. *Deake J. M. The molecular basis of mutation, Holden-Day, San Francisco, 1970.*
4. *Ames B. N. Science, v. 204, p. 587—593, 1979.*
5. *Cairns J. Cancer problem, Sci. Am. v. 233, p. 61—78, 1975.*
6. *Casida J. E., Rizo L. O. Xenobiotica, v. 16, № 10—11, p. 1003—1015, 1986.*
7. *Хачатрян Г. С., Антоян А. А., Алсвердян А. А., Саркисян Ф. А., Минасян Р. Т., Вестр, биохимия мозга, АН АрмССР, Ереван т. 9, с. 123—150, 1974.*
8. *Хачатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Ереван, «Айтастан», 1981.*
9. *Хачатрян Г. С., Галстян Г. Г., Антоян А. А., Алсвердян А. А., Хачатрян В. Г., Минасян Р. Т., Варадян А. Г., Адамян М. Х. Нейрохимия, т. 6, № 4, с. 552—664, 1987.*

Поступила 12. VI. 1991

УДК 577.171.59.175.3.7

ИЗМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛООБРАЗОВАНИЯ В ПРОДУКТИВНЫЙ ПЕРИОД ИММУННОГО ОТВЕТА НА РАЗЛИЧНЫЕ АНТИГЕНЫ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГИПОТАЛАМИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ *IN VITRO*

АПРИКЯН В. С., ГАЛОЯН К. А.

Институт биохимии им. Г. Х. Буянтяна НАН Армении, Ереван

В последние годы достигнут значительный прогресс в нейроиммунологии, благодаря расширенному представлению о взаимосвязи между нейроэндокриной и иммунной системами. Развиваются исследования в области изучения участия отдельных структур нервной ткани в функционировании иммунной системы [1—10], обнаружены рецепторы к ним на иммунокомпетентных клетках [11—13], а также их способность замещать функции иммуномедиаторов [14], выявлены иммуноактивные структуры нервной ткани, обнаружена способность самих структур их индуцировать [15—18], изучается их роль в иммунопатологиях [19, 20]. Исследуются механизмы обратной связи. Интересным представляется изучение влияния на функционирование иммунной системы обнаруженного А. А. Галояном нового класса гипоталамических пептидов (НП) [21, 22].

Целью настоящей работы явилось изучение влияния НП на антителообразование в продуктивный период иммунного ответа на различные антигены *in vitro*.

Материалы и методы

Использовали свободных от специфического бактерионосительства мышей-гибридов первого поколения (СВА×С57ВL/6J) F₁. С этой целью выборочно из органов забитых цервикальной дислокацией мышей делались мазки-отпечатки на дифференциальные питательные среды. Использовали НП, очистку и выделение которых проводили из вторичного порошка гипоталамуса с помощью метода зонального электрофореза свободного потока на аппарате фирмы Bender-Hobein ELPHOR—VAP—22 (Германия). Среди полученных нейропептидных фракций были обнаружены как коронарорасширяющие, так и коронаросуживающие фракции. НП применяли в дозах от 10³ мкг до 10⁻¹⁶ мкг в 0,9%-ном изотоническом растворе хлористого натрия. Исследовали влияние НП на антителообразование в продуктивный период иммунного ответа на поликлональный, тимуснезависимый и тимусзависимый антигены. В качестве антигенов

использовали: липополисахарид (ЛПС, из *Salmonella typhosa* 0901, Difco Lab. Detroit, Mich.) для модуляции поликлонального иммунного ответа; динитрофенил—фиколл (ДНФ-фиколл), приготовленный с использованием CNBr-фиколла (Мм 400 000, «Sigma Chem. Co», США) и 2,4-динитрофенилсина («Sigma Chem. Co», США) по методу Klaus и соавт. [23], для модуляции тимуснезависимого иммунного ответа; эритроциты барана (ЭБ)—для модуляции тимусзависимого иммунного ответа. Антигены применяли в концентрациях: ЛПС—100 мкг/мл, ЭБ— 1×10^7 /мл, ДНФ-фиколл—10 нг/мл, субкутанно, в область задней стопы.

Мышей забивали первичальной дислокацией на 1-, 2- и 4-е сутки вторичного иммунного ответа на ЛПС, ДНФ-фиколл и ЭБ соответственно. Получали клетки регионарных лимфатических узлов, которые суспендировали в среде, содержащей RPMI—1640 (Flow Lab., Inc. Virginia, США), 10%-н а телячьей сыворотки (Gibco Lab., Inc. N. Y., США), 2 мМ хепес буфера (Flow Lab., Inc. Virginia, США), 2 мМ L-глутамина (Gibco Lab., Inc. N. Y., США). Жизнеспособность клеток оценивали периодически на разных этапах исследования с помощью трипанового синего.

Суспензии клеток готовили из расчета: 5×10^6 /мл при ЛПС-ответе, и по 1×10^7 /мл при ответе на ДНФ-фиколл и ЭБ. По 0,5 мл клеточной суспензии и НП переносили в 48-луночные плиты (Corning, Pack. Corp, Cambridge), которые инкубировали при покачивании 10 в мин на аппарате Bellco (Bellco Biotechnology, Nineland, N. J.) при 37° в стальных культуральных боксах в атмосфере 10% CO₂.

Количество антителообразующих клеток (АОК) определяли спустя сутки, в модифицированном методе непрямого локального гемолиза [24], и выражали как количество АОК/10⁶ клеток. В качестве индикаторных клеток для ответа на ЛПС и ДНФ-фиколл, использовали выдержанные в растворе Олсвера ЭБ, соединенные с тринитрофенилом по методу Rittenberg и соавт. [25]. Вычисляли коэффициент стимуляции антителообразования как отношение количества АОК в опытных пробах к таковым в контрольных. Коэффициент угнетения антителообразования вычисляли как обратную стимуляции величину. Коэффициент стимуляции/угнетения обозначали как К. В контрольных пробах вместо НП применяли 0,9%-ный изотонический раствор хлористого натрия в аналогичных количествах. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

В процессе исследования среди различных НП были обнаружены НП с выраженной антителостимулирующей или антителоугнетающей активностями, условно обозначенные нами как НП-α и НП-β

соответственно. Данные по влиянию НП на формирование АОК к различным антигенам, представлены на рисунке. Можно видеть, что в случае с ЛПС антигеном стимулирующие НП (рис. А, а) проявляли активность в диапазоне доз 1 мкг— 10^{-12} мкг. Указанные дозы повышали выработку АОК в 1,26 ($p < 0,05$)—2,8 ($p < 0,001$) раза. Так, дозы 1, 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} мкг повышали продукцию АОК соответственно в 1,26 ($p < 0,05$), 1,4, 1,6, 1,9, 2,34, 2,3, 1,5 ($p < 0,001$) раза. Остальные дозы— 10^3 —10 мкг и 10^{-14} — 10^{-16} мкг не оказали существенного влияния на антителообразование ($p > 0,05$).

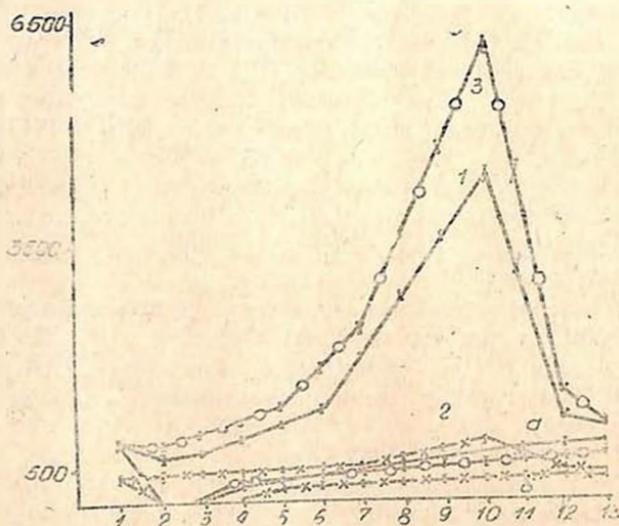


Рисунок. Влияние нового класса гипоталамических пептидов на формирование антителообразующих клеток в продуктивный период иммунного ответа к различным антигенам: липополисахариду (1), динитрофенил-фиколлу (2), эритроцитам барана (3). По оси абсцисс—дозы нового класса гипоталамических пептидов (в мкг): 1—контроль, 2— 10^3 , 3— 10^2 , 4—10, 5—1,0, 6— 10^{-2} , 7— 10^{-4} , 8— 10^{-6} , 9— 10^{-8} , 10— 10^{-10} , 11— 10^{-12} , 12— 10^{-14} , 13— 10^{-16} , α—новый класс гипоталамических пептидов α, β—новый класс гипоталамических пептидов β. По оси ординат—количество антителообразующих клеток $\times 10^6$.

Антителоугнетающие НП (рис., А, б) проявляли активность в диапазоне доз 1— 10^{-12} мкг. Они угнетали выработку АОК в 1,3 ($p < 0,05$)—2,4 ($p < 0,001$) раза. Так, дозы 1, 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} мкг угнетали антителообразование в 2,4, 1,9, 1,8, 1,7, 1,6, 1,5 ($p < 0,001$), 1,3 ($p < 0,05$) раза соответственно. Дозы 10^8 —10 мкг отменяли формирование АОК. Дозы 10^{-14} — 10^{-16} мкг не изменяли контрольный уровень выработки АОК ($p > 0,05$).

Аналогичная активность имела место и при исследовании влияния НП на антителообразование в иммунном ответе на ДНФ-фиколл (рис., Б). Так, стимулирующий эффект НП-α (рис., Б, а)

проявлялся в диапазоне доз 10^{-2} — 10^{-12} мкг и был на уровне 1,3 ($p < 0,05$)—2,6 ($p < 0,001$). Дозы 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} мкг повышали продукцию АОК соответственно в 1,4, 1,6, 1,7, 2,0, 2,6 ($p < 0,001$), 1,3 ($p < 0,05$) раза. Остальные дозы— 10^3 —1 мкг и 10^{-14} — 10^{-16} мкг существенного влияния на изменение уровня выработки АОК не оказывали ($p > 0,05$).

Антителоугнетающий эффект НП- β (рис., Б, б) проявлялся в дозах 10^{-2} — 10^{-12} мкг. Данные дозы угнетали выработку АОК в 1,2 ($p < 0,05$)—2,2 ($p < 0,001$) раза. Дозы 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} мкг угнетали продукцию АОК соответственно в 2,2, 1,8, 1,6, 1,5, 1,3 ($p < 0,001$), 1,2 ($p < 0,05$) раза. Дозы 10^3 —1 мкг отменяли формирование АОК. Дозы 10^{-14} — 10^{-16} мкг не оказывали существенного влияния на изменение контрольного уровня выработки АОК ($p > 0,05$).

Результаты исследования влияния НП на антителообразование в иммунном ответе на ЭБ представлены на рисунке (В), из которого следует, что антителостимулирующие НП (рис., В, а) проявили активность в диапазоне доз 10^{-2} — 10^{-12} мкг. Они повышали выработку АОК в 1,3 ($p < 0,05$)—4,1 ($p < 0,001$) раза. Так, дозы 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} мкг стимулировали продукцию АОК соответственно в 1,3 ($p < 0,05$), 1,7, 2,6, 3,4, 4,1, 2,5 ($p < 0,001$) раза. Остальные дозы— 10^3 —1 мкг и 10^{-14} — 10^{-16} мкг существенно не изменяли уровень выработки АОК ($p > 0,05$).

Антителоугнетающие НП (рис., В, б) проявили свою активность также в диапазоне доз 10^{-2} — 10^{-12} мкг. Они угнетали выработку АОК в 1,3 ($p < 0,05$)—2,6 ($p < 0,001$) раза. Так, дозы 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12} мкг угнетали выработку АОК в 2,6, 2,18, 1,85, 1,6 ($p < 0,001$), 1,45 ($p < 0,01$), 1,3 ($p < 0,05$) раза соответственно. Дозы 10^3 —1 мкг полностью отменяли формирование АОК. Дозы 10^{-14} — 10^{-16} мкг существенно не изменяли уровень выработки АОК ($p > 0,05$).

Таким образом, в результате проведенного исследования обнаружено, что в составе пептидной фракции гипоталамуса имеются как антителостимулирующие НП, так и антителоугнетающие. Данные свойства НП проявлялись в продуктивном периоде иммунного ответа на различные антигены: поликлональный, тимуснезависимый, тимусзависимый. Изменение антителообразования под влиянием как стимулирующих, так и угнетающих НП носило выраженный, зависящий от дозы характер. Данные фармакокинетического анализа свидетельствуют, что величина силы стимулирующего действия НП достигала максимума в диапазоне доз 10^{-8} — 10^{-10} мкг. В условиях проведенного исследования *in vitro* указанные дозы явились наиболее оптимальными.

THE CHANGES OF ANTIBODY FORMATION AT THE PRODUCTIVE PERIOD OF IMMUNE RESPONSE TO DIFFERENT ANTIGENS UNDER THE INFLUENCE OF HYPOTHALAMIC PEPTIDES IN VITRO

APRIKIAN V. S., GALOYAN K. A.

II. Cn. Buntatian Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

It was studied the effect of hypothalamic peptides on antibody formation at the productive period of immune response to polyclonal, T-independent, T-dependent antigens in vitro.

There are different antibody stimulating, as well as antibody inhibiting neuropeptides. The activity appeared at all cases investigated, and was of dose-dependent character.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Blalock J. E., Johnson H. M., Smith E. M., Torres B. A.* Biochem. and Biophys. Res. Commun. v. 125, p. 30-34, 1985.
2. *Kruger T. K., Blalock J. E.* Biochem. and Biophys. Res., Commun., v. 137, p. 197-200, 1986.
3. *Johnson H. M., Smith E. H., Torres B. A., Blalock J. E.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 79, p. 41-74, 1982.
4. *Brooks K. M., Uhr J. W., Vitella E. S.* J. Immunol., v. 133, p. 3133-3137, 1984.
5. *Pawlikowsky M., Zelazowsky P., Stepien H., Skally A. V.* Peptides. v. 8, p. 951-952, 1987.
6. *Stanisz A. M., Befus D., Bieniasz J. J.* Immunol., v. 136, p. 152-156, 1986.
7. *Payan D. G., Hess C. A., Goetzl E. J.* Cell. Immunol., v. 84, p. 433-438, 1984.
8. *Fals S., Annibale B., Fotrivant M., Santoro A., Palloae F., Delle Fave G.* J. Neuroimmunol., v. 31, p. 211-219, 1991.
9. *O. Dorisio M. S., Wood C. L., O. Dorisio T. M.* J. Immunol., v. 135, Suppl. v. 2, p. 791-796, 1985.
10. *Strom J. B., Bangs J. D.* J. Immunol., v. 128, p. 1555-1559, 1982.
11. *Scicchitano R., Dazin P., Bieniasz J., Payan D. G., Stanisz A. M.* Brain. Behav. Immunol., v. 1, p. 173, 1987.
12. *Huruma K., Koike T., Nakamura H., Sumida T., Maeda T., Tomidaka H., Yoshida S., Fujita T.* Immunology, v. 71, p. 480-485, 1990.
13. *Nakamura H., Koike T., Hiruma K., Sato T., Tomidaka H., Yoshida S.* Immunology, v. 62, p. 665, 1987.
14. *Torres B. A., Johnson H. M.* J. Neuroimmunol., v. 17, № 1, p. 85, 1987.
15. *Smith E. M., Morrill A. C., Meyer W. J., Blalock J. E.* Nature, v. 322, p. 881-882, 1986.
16. *Kavetsaars A., Pallieux R. E., Heijnen C. J.* J. Immunol., v. 142, p. 1338-1342, 1989.
17. *O. Dorisio M. S., O. Dorisio T. M., Catland S., Balcerrak S. J.* J. Lab. Clin. Med., v. 96, p. 662-672, 1980.
18. *Blalock J. E.* Physiol. Rev., v. 69, № 1, p. 1-32, 1989.
19. *Vohemayer K., Shuff-Warnz P., Nagel G. A.* Clin. Immunol. Immunopathol., v. 41, p. 290-294, 1986.

- K., Matt V. Int. Arch. Allergy. Appl Immun., v. 81, p. 368, 1985.*
21. *Galoyan A. A. Ergebnisse der Experimentelle Medizin, v. 29, p. 99-115, 1978.*
22. *Galoyan A. Neurochem. Res., v. 11, p. 769-787, 1986.*
23. *Klaus G. G., Phillips J. M., Hymphrey J. L., Presser D. W., Cross A. M. Eur. J. Immunol., v. 6, p. 429-433, 1976.*
24. *Jerne N. K., Nordin A. A. Science, v. 140, p. 405, 1963.*
25. *Rittenberg M. B., Pratt K. L. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., v. 137, p. 575-581, 1969.*

Поступила 22. V. 1992

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.15+616.833—018:616.447

ВЛИЯНИЕ ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В НЕРВНОЙ ТКАНИ

ТЕР-МАРКОСЯН А. С., ХУДАВЕРДЯН Д. Н.

Ереванский государственный медицинский институт

Особое место в клеточной и молекулярной эндокринологии занимает изучение механизмов восприятия, переработки и реализации гормонального сигнала клеткой. В наших предыдущих исследованиях [1, 2] по изучению действия паратиреоидного гормона (ПТГ) на нервную ткань были выявлены феномен его рецепции мембраной синапсосомы коры головного мозга крыс, нейроном околоушного ганглия улитки *Helix* и нарушение синаптической передачи, то есть были выяснены начальное и конечное звенья гормонального воздействия.

Как известно, влияние ПТГ на клетки, признанные в качестве мишеней, осуществляется по сАМР-зависимому механизму [3, 4]. Если допустить, что аналогичным образом осуществляется действие ПТГ и на нейроны, то следует ожидать однонаправленные изменения в них и со стороны содержания циклических нуклеотидов.

Целью настоящего исследования явилось изучение сдвигов уровня сАМР и сGMP в синапсосомах крыс и ганглиях улитки, что дало бы возможность оценить хеморецептивную способность нейрональных мембран в эволюционном аспекте. Эти исследования важны как для оценки влияния ПТГ на передачу информации с мембраны на внутриклеточные структуры, так и на запуск выброса нейромедиатора пресинаптическими структурами [5, 6].

Объектом исследования служили белые беспородные крысы-самцы массой 190—200 г и улитки *Helix*.

Синапсосомы, выделенные из коры головного мозга крыс методом Najos [7], в количестве 50 мкг белка инкубировали в среде, содержащей (в мМ): NaCl—145, KCl—5, NaH₂PO₄—1,5, MgCl₂—1,3, CaCl₂—0,02, глюкозу—10, трис-HCl—20, pH 7,4, при 37°. ПТГ в виде паратиреоидной субстанции («Sigma», США) добавляли в инкубационную среду в концентрации 10⁻⁹ М, а через 20 мин вводили в раствор ЭДТА в концентрации 5·10⁻³ М и смесь центрифугировали при 15 000 об/мин в течение 15 мин. К осадку добавляли 1 мл абсолютного спирта и через 5 мин центрифугировали при 10 000 об/мин

протяжении 15 мин. Для определения сАМР и сGMP экстракт в количестве 0,5 мл разливали по пробиркам, предварительно высушив его под вакуумом при 55°.

Для изучения действия ПТГ *in vivo* крысам в течение 7 дней внутримышечно вводили ПТГ из расчета 0,5 ед/100 г массы животного. Выделение синапсом и экстракцию циклических нуклеотидов проводили по вышеописанным методам. Параллельно в сыворотке крови животных определяли содержание общего кальция, фосфора, ионизированного кальция, калия и натрия. Первые два параметра определяли атомно-адсорбционным методом, а остальные—при помощи ионселективного анализатора Microlyte («Копе», Финляндия).

Отирецированные окологлоточные ганглии улиток инкубировали в среде, содержащей (в mM): NaCl—85, KCl—4, CaCl₂—7, MgCl₂—14, глюкозу—10, трис-HCl—10, pH 7,6 при 18°. Опытные пробы инкубировали с ПТГ в концентрации 10⁻¹⁰ M. Выбор различных концентраций ПТГ для синапсом (10⁻⁹ M) и ганглиев (10⁻¹⁰ M) обусловлен их максимальным эффектом на вход Ca²⁺ в эти структуры [2, 8]. После инкубации в течение 20 мин ганглии гомогенизировали в 0,3 мл 50 mM раствора трис-HCl, содержащего 5 mM ЭДТА, pH 7,4. К гомогенату добавляли 2 мл абсолютного этанола и через 5 мин центрифугировали его при 10000 г в течение 15 мин. Для определения сАМР и сGMP надосадочную жидкость (экстракт) высушивали под вакуумом при температуре 55°. Для определения их содержания в экстрактах пользовались стандартными наборами («Amersham», Англия) и выражали его в синапсоммах в пмоль/мг белка, а в ганглиях—в пмоль/мг массы ткани. Количество белка в пробах определяли методом Izhaci, Gilл [9], а статистическую обработку полученных результатов проводили методом Стьюдента—Фишера.

Как явствует из табл. 1, под действием ПТГ имеет место увеличение содержания сАМР и особенно сGMP соответственно на 85 и 57%. Интенсификация процесса образования сАМР происходит и в синапсоммах, где уровень нуклеотида по сравнению с контролем возрастает примерно вдвое. Противоположные сдвиги, хотя и статистически недостоверные, прослеживаются в отношении содержания сGMP.

Как вытекает из результатов, приведенных в табл. 2, многократные внутримышечные введения ПТГ сопровождаются проявлением однотипных сдвигов в виде повышения в нервных окончаниях *in vivo* уровней сАМР и сGMP более чем в 1,5 и 2 раза по сравнению с контролем соответственно. При этом выявлена тенденция к увеличению в сыворотке крови содержания ионизированного кальция и понижению количества общего фосфора.

Эти результаты, наряду с ранее полученными данными [2, 8] по повышению уровня Ca²⁺ в нервной клетке под влиянием ПТГ, проливают свет на высказанное нами мнение [10] о стимулирую-

нием действия ПТГ на процесс фосфорилирования мембранных белков путем активирования сАМР-, сGMP- и Ca^{2+} -зависимых протеинкиназ. В реализации механизма выброса нейромедиатора ключевое место занимает фосфорилирование белков нервных окончаний [11, 12]. По имеющимся данным [13, 14], одним из возможных механизмов высвобождения ГАМК является везикулярный путь, а

Таблица 1

Влияние паратиреоидного гормона на сдвиги содержания сАМР и сGMP в синапсосамах коры головного мозга крыс (в пмоль/мг белка) и нейронах окологлоточного ганглия улитки *Helix* (в пмоль/мг массы ткани) *in vitro*

Объект	Условия опыта	сАМР	сGMP
Синапсосы	контроль	$16,28 \pm 1,58$ n=5	$2,78 \pm 0,88$ n=5
	ПТГ 10^{-9} М	$23,12 \pm 3,34^{**}$ n=7	$0,74 \pm 0,4$ n=7
Нейрон	контроль	$0,4 \pm 0,04$ n=16	$0,04 \pm 0,003$ n=8
	ПТГ 10^{-10} М	$0,6 \pm 0,1^*$ n=9	$0,07 \pm 0,008^{**}$ n=8

Таблица 2

Содержание сАМР и сGMP (в пмоль/мг белка) в синапсосамах коры головного мозга и Ca , P , Ca^{2+} , K^+ , Na^+ (в ммоль/л) в крови крыс после ежедневного внутримышечного введения в течение 7 дней паратиреоидина в дозе 0,5 ед/100 г массы животного

Условия опыта	сАМР	сGMP	Ca	P	Ca^{2+}	K^+	Na^+
Контроль n=3	$8,93 \pm 0,61$	$4,93 \pm 0,38$	$2,04 \pm 0,05$	$2,02 \pm 0,29^*$	$0,77 \pm 0,08$	$7,5 \pm 0,61$	$145,5 \pm 2,63$
Паратиреоидин n=5	$14,17 \pm 0,86^{**}$	$13,97 \pm 2,9^{**}$	$1,96 \pm 0,04$	$1,52 \pm 0,20^*$	$0,89 \pm 0,04$	$6,70 \pm 0,25$	$157,08 \pm 10,49$

Примечание: *—достоверные отличия от контроля ($p < 0,05$); **—достоверные отличия от контроля ($p < 0,01$); n—число наблюдений.

фигурирующий в его основе процесс фосфорилирования белков везикул и пресинаптической мембраны, являющийся лимитирующим звеном взаимодействия везикул с пресинаптической мембраной, по всей вероятности, является определяющим. Не исключено, что изменение содержания сАМР и сGMP в синапсосамах может обусловить установленную нами ранее [2] активацию спонтанного выброса тормозного нейромедиатора ГАМК нервными окончаниями коры головного мозга крыс под влиянием ПТГ. Поэтому на основании приведенного нами фактического материала можно заключить, что сдвиги в содержании сАМР и сGMP в нервной ткани могут играть решающую роль в переработке и реализации эффекта ПТГ. На основании полученных результатов можно сделать вывод об универсальном влиянии ПТГ на нервную ткань животных, стоящих на различных ступенях эволюционного развития.

THE EFFECT OF PARATHYROID HORMONE ON CYCLIC NUCLEOTIDE CONTENTS IN NEURONAL TISSUE

TER-MARKOSIAN A. S., HEDAVERDIAN D. N.

State Medical Institute, Yerevan

The contents of cAMP and cGMP in rat brain cortex synaptosomes and *Helix pomatia* ganglia neurones under the parathormone influence was studied by radioimmunological assay. The level of two nucleotides increased in ganglia in vitro parathormone influence condition and rat synaptosomes after the injections in a week daily of parathyroidine in dose 0,5 unit/100 g mass. The influence of parathormone in vitro on synaptosomes is accompanied by the increase of only cAMP contents.

It was discussed the role of cyclic nucleotides in the mechanism of realising neuromediators from synaptosomes by phosphorylation of proteins of vesicle and presynaptic endings.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Худавердян Д. Н., Тер-Маркосян А. С., Саргсян Г. Р. Нейрохимия, т. 8, № 2, с. 210—215, 1989.
2. Луценко В. К., Тер-Маркосян А. С., Хлебникова Н. Н., Худавердян Д. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 103, № 8, с. 146—149, 1987.
3. Aurbach G. D., Chase L. R. Fed. proc., v. 29, № 4, p. 1179—1183, 1970.
4. Murad F., Weitzman R. In Endocrinology, Amsterdam, Excerpta Medical., p. 468—473, 1973.
5. Greengard P., Kebabian J. W. Fed. proc., v. 33, p. 1059—1067, 1974.
6. Rauch N., Roskoski R. J. J. Neurochem., v. 43, p. 755—762, 1974.
7. Hajos F. Brain Res., v. 91, p. 485—489, 1975.
8. Худавердян Д. Н., Тер-Маркосян А. С., Айрапетян С. Н. — В кн.: Кальцийрегулирующая система в норме и патологии (под ред. Д. Н. Худавердяна), с. 21—26, Ереван, Айастан, 1988.
9. Itzhaki R., Gill D. Anal. Biochem., v. 9, № 4, p. 401—420, 1964.
10. Худавердян Д. Н., Тер-Маркосян А. С., Айрапетян С. Н. — В кн.: Четвертый съезд Армянского физиологического общества, Ереван, АН АрмССР, с. 93—94, 1987.
11. Северин Е. С., Кочеткова М. Н. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности, М., Наука, 1985.
12. Burke V. E., DeLorenzo R. J. Neurochem., v. 33, p. 1059—1067, 1974.
13. Lohdesmaki P., Karpdinen A., Saarni H. Brain Res., v. 138, № 2, p. 295—308, 1977.
14. Zisapic N., Zurgil N. Life Sci., v. 23, p. 231—235, 1978.

Поступила 9. VII. 1991

УДК 616.853—092.9—07:616.155.34—008.13

РОЛЬ ФАКТОРОВ ПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ
В ФОРМИРОВАНИИ ЭПИЛЕПТИФОРМНЫХ ПРОЯВЛЕНИЙ
ПРИ ПИКРОТОКСИНИНДУЦИРОВАННОМ
КИНДЛИНГЕ У КРЫС

ШАНДРА А. А., ГОДЛЕВСКИЙ Л. С., МАЗАРАТИ А. М.,
ВОВЧУК С. В., СЕРВЕЦКИЙ К. Л.

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Фармакологический киндлинг как модель хронической эпилептизации мозга отличается устойчивостью наблюдаемых функциональных и метаболических нарушений, характеризующих собой механизмы возникновения и развития эпилептической системы [1]. Имеющаяся научная информация свидетельствует о важном значении некоторых пептидов в регуляции эпилептогенеза при киндлинге, формируемом повторными введениями коразола [2] и пикротоксина [3].

В настоящей работе приведены результаты влияния пептидсодержащих экстрактов мозга и его отдельных образований—ВОМ и гиппокампа крыс, подвергнутых фармакологическому киндлингу повторными введениями пикротоксина, на эпилептическую активность у интактных крыс-рецидивентов, а также результаты определения содержания в данных структурах β -эндорфина, Met-энкефалина и дельта-сониндуцирующего пептида.

Использовали 70 крыс-самцов линии *Wistar* массой от 180 до 250 г. У половины животных вызывали киндлинг с помощью однократных ежедневных введений пикротоксина в подпороговой (1,0—1,2 мг/кг) дозе [3]. Повторное введение конвульсанта сопровождалось появлением и нарастанием тяжести судорожных реакций от отдельных вздрагиваний до генерализованных клонико-тонических судорожных приступов. В опытах использовали животных, у которых последовательно наблюдалось не менее четырех генерализованных судорожных припадков, провоцируемых тестирующим введением пикротоксина (1,0—1,2 мг/кг). Контрольной группе животных (35 крыс) ежедневно однократно вводили 0,9%-ный физиологический раствор. Через 24 ч после последней инъекции препаратов живот-

ных декапитуровали, удаляли головной мозг со стволом, иссекали ткани гиппокампа билатерально по координатам атласа [4] от AP=2,0 до AP=3,2 и BOM—на протяжении от AP=-4,8 до AP=-6,3 [2]. В удаленный участок входили черная субстанция, паранигральное ядро, вентральная зона покрышки, ростральная часть интерпедункулярного ядра, ядро шва, а также каудальные отделы мамиллярных тел. Полученные пробы тканей замораживали в жидком азоте и хранили при -20° . Образцы лиофилизировали и проводили экстракцию пептидной фракции кипящей 1 М уксусной кислотой в соотношении 1:10 в течение 20 мин и экстракт охлаждали и центрифугировали при 3000 об/мин при 4° [2, 5]. Полученный супернатант замораживали и подвергали лиофильной сушке. Сухой экстракт перед введением растворяли в 0,9%-ном физиологическом растворе. Изучение эффектов экстрактов проводили на крысах линии *Wistar* массой 180—300 г, которым по координатам атласа 4 под эфирным рауш-наркозом осуществляли внутрижелудочковое (AP = -0,8, L = 1,2, H = 3,5) введение экстрактов (20 мкг/животное) в объеме 5,0 мкл со скоростью 1,0 мкл/мин, через 10—20 мин производили внутрибрюшинное введение пикротоксина (2,0 мг/кг). За развитием судорожных реакций наблюдали в течение 45 мин. Налоксон («Dupont», США) вводили в дозе 1,0 мг/кг за 10 мин до применения пикротоксина. Учитывали латентный период первых судорожных проявлений и тяжесть судорог, которую оценивали в баллах по принятой шкале [2].

Определение содержания эндогенных пептидов проводили с помощью конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) на 96-луночных полистироловых планшетах. В работе использовали кроличьи моноспецифические поликлональные антитела к Met-энкефалину, β -эндорфину и дельта-сенсибилизирующему пептиду с титрами 1:2000, 1:10000 и 1:50000 соответственно. Для количественного определения пептидов использовали соответствующие калибровочные графики, которые получали применительно к индивидуальным планшетам. Результаты обрабатывали статистически [6].

На рис. 1 представлены эффекты внутрижелудочкового введения экстрактов разных отделов мозга киддлинговых животных и животных контрольной группы на эпилептическую активность, вызванную у крыс-рецидивистов внутрибрюшинным введением пикротоксина (2,0 мг/кг). Судороги, индуцируемые у крыс пикротоксином после внутрижелудочкового введения 5,0 мкл 0,9%-ного физиологического раствора, характеризовались клонусами мышц туловища, а также судорожными вздрагиваниями (рис. 1). Как видно из рис. 1, 2, применение экстракта ткани гиппокампа киддлинговых крыс не изменяло ($p > 0,05$) тяжести судорожных реакций, провоцируемых пикротоксином, по сравнению с таковой у животных контрольных групп (внутрижелудочковое введение физиологического

раствора, а также экстракта гиппокампа крыс контрольной группы). Введение экстракта мозга (без гиппокампа) крыс, подвергнутых киндлингу, вызывало статистически достоверное усиление ($p < 0,05$) судорожных проявлений, вызванных конвульсантом (рис. 1, 3). При применении экстракта «остального» мозга у животных-реципиентов наблюдались ярко выраженные проявления клонусов мышц туловища и передних конечностей. Внутрижелудочковые инъекции интактным крысам-реципиентам экстракта ВОМ киндлинговых крыс сопровождалась развитием интенсивных пикротоксининдуцированных

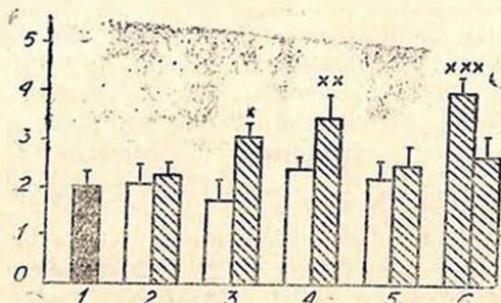


Рис. 1. Влияние экстрактов различных отделов мозга на судорожную активность, вызванную пикротоксином у крыс. Во всех группах введение пикротоксина (2,0 мг/кг) производилось через 20 мин после внутрижелудочковой инъекции экстрактов (20 мкл/животное). По оси абсцисс: 1—эффект пикротоксина у животных, которым производили внутрижелудочковое введение 5,0 мкл 0,9%-ного раствора NaCl, 2 и 3—введение экстракта гиппокампа и «остального» мозга киндлинговых крыс; 4 и 5—введение экстракта ВОМ и «остального» мозга киндлинговых крыс; 6—эффект экстрактов ВОМ до (первый столбик) и после (второй столбик) введения налоксона (1,0 мг/кг). По оси ординат: тяжесть судорог (баллы). Светлый столбик—эффект экстрактов мозга животных, контрольной и заштрихованный—киндлинговой групп. *— $p < 0,05$, **— $**p < 0,01$, *** $p < 0,001$

клонических судорог конечностей и туловища, а у 3-х из 7 животных развивались даже генерализованные клонико-тонические судорожные припадки (рис. 1, 4). Степень тяжести последних статистически достоверно превышала такую у животных контрольной группы ($p < 0,01$). В аналогичных условиях эксперимента на фоне внутрижелудочкового применения экстракта мозга киндлинговых животных без ВОМ не обнаруживались сколь-нибудь заметные изменения интенсивности проявления судорожных реакций, индуцированных у животных-реципиентов (рис. 1, 5). Как видно из рис. 1, 6 введение пикротоксина в условиях применения экстракта ВОМ киндлинговых крыс и предварительного введения налоксона (1,0 мг/кг) сопровождалось развитием судорожных реакций, степень выраженности которых статистически достоверно ($p < 0,001$) усту-

лала таковой при провоцировании судорог после внутрижелудочкового введения одного лишь экстракта ВОМ.

Изучение уровня содержания пептидов показало, что как в гиппокампе, так и в структурах ВОМ мозга кидлинговых крыс происходит его высокодостоверное снижение (рис. 2), особенно β -эндорфина в образованиях ВОМ, где оно доходило до 95% по сравнению с таковым у животных контрольной группы. Наименьшее понижение содержания дельта-соницирующего пептида в гиппокампе составляло 63% (рис. 2, 3).

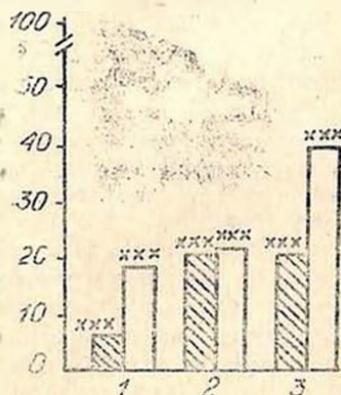


Рис. 2. Изменения содержания пептидов в структурах ВОМ и гиппокампа при пикротоксинвызванном кидлинге у крыс. 1, 2, 3—соответственно уровень β -эндорфина, Met-энкефалина и дельта-соницирующего пептида в % по сравнению с таковым у животных контрольной группы, принятым за 100% и обозначенным горизонтальной линией. Заштрихованный столбик—уровень пептидов в ВОМ, светлый столбик—в гиппокампе; *** $p < 0.001$

Таким образом, приведенные результаты показывают, что в условиях формирования кидлинга с помощью повторных введений пикротоксина в подпороговой дозе в мозгу крыс происходит накопление пептидных соединений, обладающих эпилептогенным действием. Эти вещества обнаруживаются в структурах ВОМ и их эффект устраняется введением палоксона в относительно небольшой дозе, что свидетельствует о возможном осуществлении эпилептогенного действия путем активации μ -опиатных рецепторов. Эти результаты соответствуют ранее полученным данным о накоплении эпилептогенных факторов в мозгу крыс при коразолницирующем кидлинге, свидетельствующим о существовании общих патогенетических механизмов разных видов фармакологического кидлинга [2]. Обнаружение снижения уровня β -эндорфина, Met-энкефалина и дельта-соницирующего пептида в структурах ВОМ исключает роль этих веществ в обеспечении эпилептогенного эффекта экстрактов и речь может идти лишь о накоплении при кидлинге неидентифицированного μ -опиатного агониста.

Ранее нами было показано [1] ключевое значение формирования детерминантной структуры гиппокампа в развитии эпилептической активности при коразол- и пикротоксининдуцированном кидлинге. В настоящем исследовании было обнаружено, что ее формирование сопровождается снижением уровня β -эндорфина, Met-энке-

фалина и дельта-соннидующего пептида в отсутствие накопления в гиппокампе эпилептогенных пептидных соединений.

В ряде работ [7—10] показано, что при киндлинге, вызываемом пентилснететразолом, а также электрическими стимуляциями миндалины в лимбических структурах происходит увеличение содержания Met-энкефалина. Противоположный характер настоящих данных может быть обусловлен как различиями механизмов пикротоксининдуцированного и других форм киндлинга, так и использованием в нашей работе наиболее выраженных форм эпилептического синдрома, характеризующихся повторными клонико-тоническими приступами, при развитии которых отмечается снижение содержания опиоидных пептидов в мозгу животных [8].

Нами было показано противозипилептическое действие дельта-соннидующего пептида в условиях коразолового киндлинга, а также при введении пептида в ретикулярную часть черной субстанции [11, 12]. Полученные результаты позволяют полагать, что снижение количества эндогенного дельта-соннидующего пептида может быть одним из механизмов эпилептогенных эффектов киндлинга. В этой связи представляют интерес данные о блокировании под влиянием дельта-соннидующего пептида эффектов кортикотропин-рилизинг гормона [13], однократное внутримозговое введение которого сопровождается развитием киндлингоподобной эпилептической активности [14]. Кроме того, он принимает также участие в регуляции синтеза опиоидных пептидов из проопиомеланокортина [15]. Таким образом, снижение содержания дельта-соннидующего пептида может вызывать как усиление эпилептогенного действия кортикотропин-рилизинг гормона, так и, возможно, усиливать синтез эпилептогенных агонистов μ -опиоидных рецепторов.

Таким образом, проведенные исследования показали, что при пикротоксининдуцированном киндлинге у крыс формирование эпилептиформных реакций обусловлено накоплением в структурах мозга эпилептогенных пептидных факторов, а также снижением в них содержания эндогенных пептидов, обеспечивающих противозипилептическое действие.

THE ROLE OF PEPTIDE FACTORS IN EPILEPTIFORM ACTIVITY DEVELOPMENT UNDER CONDITION OF PICROTOXIN-INDUCED KINDLING IN RATS

SHANDPA A. A., GODLEVSKY L. S., MAZARATI A. M., VOVCHUK S. V.,
SERVEISKY K. L.

N. J. Pirogov Odessa Medical Institute

The peptide-containing extracts were emitted from the ventral mesencephalic region (VMR) and hippocampal tissue of rats kindled with subconvulsant doses of picrotoxin. Extracts were prepared with the help

of hot acetic acid from the brain of those animals which had not less than four seizure generalized fits. The intraventricular VMR-extracts administration to intact recipient rats increased the seizures induced with systemic picrotoxin injection. This effect of VMR-extract was not observed after preliminar naloxon (1,0 mg/kg) injection. The prominent decrease of β -endorphin, Met-enkephalin and delta-sleep inducing peptide in VMR and hippocampal tissue of kindled animals was shown using the method of immunoenzyme analysis. Authors come to the conclusion that delta-sleep inducing peptide decrease is a significant mechanism of kindled epileptic activity development.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Шандра А. А., Годлевский Л. С., Мазарати А. М. Успехи физиол. наук, т. 21, № 4, с. 50—68, 1990.
2. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Годлевский Л. С., Карсанов М. Ю., Мазарати А. М., Макулькин Р. Ф. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, т. 110, № 7, с. 14—17, 1990.
3. Крыжановский Г. Н., Шандра А. А., Годлевский Л. С., Мазарати А. М. Нгуен Тхи Тхань, Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 111, № 3, с. 235—239, 1991.
4. Paxinos G., Watson C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press, N. Y., 1982.
5. Bloom F. E., Rossien J., Ruffenbug A. Advanc. Biochem. Psychopharm. Med., v. 18, p. 89—109, 1978.
6. Сепетлиев Д. Статистические методы в научных медицинских исследованиях, М., 1968.
7. Naranjo J. R., Iadorola M. J., Costa F. J. Neurosci. Res., v. 16, № 1, p. 75—87, 1986.
8. Talavera E., Otana-Zapata I., Asai M., Condes-Lara M. Brain Res., v. 485, № 1, p. 141—148, 1989.
9. Vindrola O., Briones R., Asai M., Fernandez-Guardiola A. Neurosci. Lett., v. 21, p. 39—43, 1981.
10. Vindrola O., Asai M., Zubieta M., Talavera E., Rodriguez E., Linares G. Brain Res., v. 397, p. 121—125, 1984.
11. Шандра А. А., Крыжановский Г. Н., Годлевский Л. С., Макулькин Р. Ф., Михалева И. И., Иванов В. Т. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 106, № 9, с. 269—271, 1988.
12. Шандра А. А., Годлевский Л. С., Мазарати А. М. — В сб.: II Всесоюзн. конф. по нейронаукам, Киев, с. 158, 1988.
13. Graf M. V., Kastin A. J., Coy K. H., Fishman A. J. Neuroendocrinology, v. 4-1 p. 353, 1985.
14. Weiss S. R. B., Post R. M., Gold P. M., Chrousos G., Sullivan T. L., Walker P., Pert A. Brain Res., v. 372, № 2, p. 345—351, 1986.
15. Ball R. Brit. J. Hosp. Med., v. 37, № 1, p. 49—50, 1987.

Поступила 19. VII. 1991

УД 577.112:577.152

ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КАЛЬМОДУЛИНА К ЕГО АНТАГОНИСТАМ ПОД ВЛИЯНИЕМ КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ ГИПОТАЛАМУСА

БАРХУДАРЯН Н. А., БАРСЕГЯН К. С., АВЕТИСЯН Н. А.,
ЗАКАРЯН Т. Р., ГАЛОЯН А. А.

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

За последние несколько лет нами накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о том, что коронаросуживающие пептидные факторы гипоталамуса (ПФ₁₋₅) [1] связываются с молекулой кальмодулина (как в присутствии, так и в отсутствие Ca²⁺) [2, 3], и таким путем оказывают регуляторное воздействие на активность некоторых Ca²⁺-кальмодулинзависимых ферментов [4]. Недавно было установлено, что ПФ₁₋₅ связываются как с N-, так и с C-концевыми доменами кальмодулина, что типично для таких известных антагонистов кальмодулина, как трифторперазин (ТФП) и меллитин [5, 6]. Ранее при исследовании кооперативного эффекта ПФ₁₋₅ и ТФП на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело нами было установлено, что ПФ₁₋₅ изменяют чувствительность кальмодулина к ТФП [2, 3]. ТФП, связываясь с кальмодулином, препятствует его взаимодействию с различными Ca²⁺-кальмодулинзависимыми ферментами [7—9] и тем самым оказывают воздействие на ряд важнейших метаболических процессов, протекающих в клетке.

Представляло значительный интерес изучение действия ТФП, а также других антагонистов кальмодулина при сочетании с ПФ₁₋₅ на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитело.

В данной работе сообщается об исследовании кооперативного воздействия ПФ₁₋₅ и таких антагонистов кальмодулина, как ТФП, хлорпромазин, N-(6-аминогексил)-5-хлоро-1-нафтален-сульфонамид (W-7), вибластин, винкристин [10—12] на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело.

ПФ₁₋₅ выделяли из гипоталамуса быка по методу Галояна и соавт. [1].

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

сорбентного анализа (ELISA) с некоторыми модификациями по методу Van Eldik и соавт. [10]. Кальмодулин в концентрации 2,5 мкг/мл был иммобилизован на платах при 4° в течение 18 ч. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл и платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. В экспериментах по определению кооперативного воздействия ПФ в концентрации, равной I_{50} , и антагонистов кальмодулина (использовали различные концентрации антагонистов кальмодулина от 0,8 до 500 мкМ) на процессе образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело, исследуемые соединения вносили в лунки плат вместе с антителами. Анти-IgG, конъюгированный с пероксидазой хрена, вносили в лунки плат в разведении 1:1000, и платы инкубировали 2 ч при комнатной температуре. Через 60 мин после добавления субстрата (H_2O_2 и *o*-фенилендиамина) содержимое лунок фиксировали добавлением 2 н. H_2SO_4 и измеряли поглощение при 492 нм.

Гидролиз кальмодулина (2 мг/мл) трипсином был проведен в присутствии 0,1 М $CaCl_2$ по методу Grabikowski и соавт. [13]. Фрагменты кальмодулина (1—77 и 78—148) были выделены из гидролизата в гомогенном виде по методу Olegini и соавт. [14] с использованием ВЭЖХ в обращенной фазе на колонке Li Chromorb 5 RP—18 (0,4—25 см. диаметр) частиц—5 мкм; «Bio Separation Technologies», Венгрия), Элюцию проводили 10 мМ $(NH_4)_2CO_3$ с использованием линейного градиента ацетонитрила от 10 до 40%. Скорость элюции составляла 1 мл/мин. Время изменения градиента—20 мин. Поглощение измеряли при 214 нм. Фрагменты кальмодулина были лиофилизированы и хранились при —20°.

В работе использованы следующие реактивы: кальмодулин, антитела против бычьего кальмодулина, анти-IgG, конъюгированный пероксидазой хрена («Sigma», США), ТФП, винбластин, винкристин, W-7, хлорпромазин («Chinoin Pharmaceutical», Венгрия), ацетонитрил («Merck», ФРГ).

Исследования, проведенные с помощью метода ELISA выявили, что антагонисты кальмодулина—ТФП, хлорпромазин, W-7, винбластин, винкристин в зависимости от своей концентрации могут оказывать двоякое воздействие на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело. Как можно заметить из рис. 1, а, при низких концентрациях эти соединения стимулируют, а при высоких концентрациях—подавляют процесс образования иммунокомплекса кальмодулин—антитело.

Овади и соавт. [15, 16] на примере изучения воздействия ТФП на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитело высказали предположение, что при высоких концентрациях ТФП связывается с С-концевым доменом кальмодулина (где расположен антигенный участок кальмодулина—последовательность аминокислот 137—143), вызывая такие конформационные изменения в его молекуле, которые приводят к потере сродства кальмодулина к анти-

лам, а при низких концентрациях ТФП, по-видимому, связываются с N-концевым доменом, вызывая иные конформационные изменения в молекуле кальмодулина, вероятнее всего, в С-концевом домене, которые приводят к повышению сродства кальмодулина к антителам. Высказанное предположение указывает также на существование внутримолекулярного взаимодействия между N- и С-концевыми до-

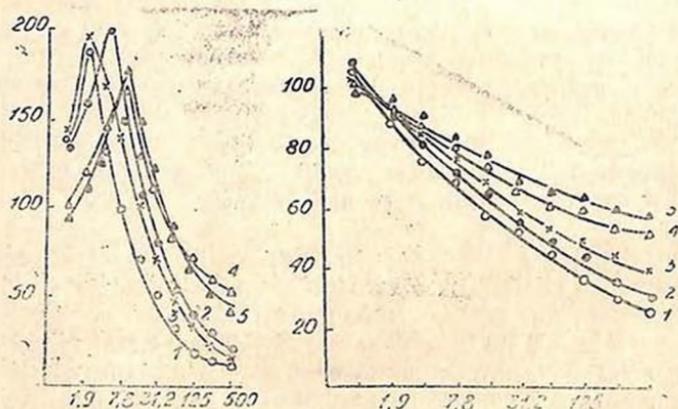


Рис. 1. а. Влияние антагонистов кальмодулина на образование иммунного комплекса кальмодулин-антитело. Был использован метод непрямого ELISA с применением кроличьих антител против бычьего кальмодулина. Кальмодулин был иммобилизован на платах в концентрации 2,5 мкг/мл. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. 1—трифторперазин; 2—хлорпромазин; 3—W-7; 4—винбластин; 5—винкристин. По оси абсцисс—концентрации антагонистов кальмодулина в мкМ, по оси ординат—% образования иммунного комплекса кальмодулин-антитело б. Влияние антагонистов кальмодулина на образование иммунного комплекса С-концевой фрагмент кальмодулина-антитело. С-концевой фрагмент кальмодулина (последовательность аминокислот 78-148) был иммобилизован на платах в концентрации 3,6 мкг/мл. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. 1—трифторперазин; 2—хлорпромазин; 3—W-7; 4—винбластин; 5—винкристин. По оси абсцисс—концентрация антагонистов кальмодулина в мкМ, по оси ординат—% образования иммунного комплекса

менами кальмодулина при связывании его с ТФП. Нами были проведены эксперименты, подтверждающие высказанную гипотезу. Основываясь на полученных результатах, мы предположили, что дозозависимый эффект хлорпромазина, W-7, винбластина и винкристина на процесс образования иммунного комплекса можно, по-видимому, также объяснить вышеприведенной гипотезой. Для проверки этого предположения на платах вместо интактного кальмодулина был иммобилизован его С-концевой фрагмент [78—148].

Как видно из рис. 1, б, в случае, когда на платах был иммобилизован С-концевой фрагмент кальмодулина, все исследуемые соединения теряли способность стимулировать образование иммунокомплекса, что, очевидно, обусловлено связыванием антагонистов кальмодулина с его N-концевым фрагментом.

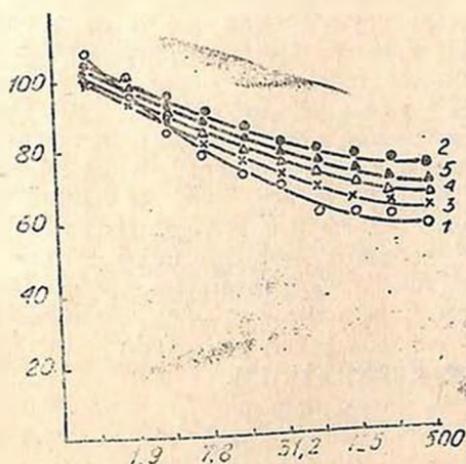


Рис. 2. Кооперативное воздействие антагонистов кальмодулина и коронаросуживающего пептидного фактора (ПФ₃) в концентрации, равной I₅₀ (15,8 нМ) на образование иммунокомплекса кальмодулин-антитела. Кальмодулин был иммобилизован на платах в концентрации 2,5 мкг/мл. Антитела вносили в лунки плат в концентрации 7,5 мкг/мл. 1—ПФ₃+трифторперазин; 2—ПФ₃+хлорпромазин; 3—ПФ₃+W-7; 4—ПФ₃+винбластин; 5—ПФ₃+винкристин. По оси абсцисс—концентрация антагонистов кальмодулина в мкМ, по оси ординат—% образования иммунокомплекса

Учитывая вышеприведенные данные, мы исследовали кооперативное воздействие антагонистов кальмодулина и коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса (ПФ₁₋₅) на процесс образования иммунокомплекса кальмодулин-антитела. Ранее нами было обнаружено, что ПФ₁₋₅ в значительной степени (до 90%) ингибировали [2, 3] связывание антител с кальмодулином в концентрации, меньшей на три порядка, чем ТФП. Концентрации, при которых ПФ₁₋₅ вызывали 50%-ное ингибирование образования иммунокомплекса (I₅₀), находились в диапазоне от 2,5 до 31,6 нМ для различных ПФ. В проведенных экспериментах были использованы постоянные концентрации ПФ₁₋₅ равные I₅₀ и различные концентрации антагонистов кальмодулина от 0,8 до 500 мкМ. ПФ в сочетании с различными антагонистами кальмодулина оказывает один и тот же эффект на процесс образования иммунокомплекса. Во-первых, происходит исчезновение стимулирующего эффекта антагонистов кальмодулина на процесс образования иммунокомплекса. Во-вторых, наблюдается снижение ингибиторного эффекта, характерного для высоких концентраций антагонистов кальмодулина на про-

песс образования иммунокомплекса (для хлорпромазина—на 42%, для ТФП—на 32%, для W-7, винбластин и винкристин—на 15–20%). Антагонисты кальмодулина, в свою очередь, также изменяют чувствительность кальмодулина к ПФ₁₋₅; происходит снижение ингибиторного эффекта ПФ₁₋₅ [2, 3] на процесс образования иммунокомплекса на 45% и более.

Известно, что кальмодулин связывает фенотиазины (ТФП, хлорпромазин) по двум классам центров. Один класс центров (для ТФП характерно 24–27 таких центров, а для хлорпромазина—17) обладает низким сродством к фенотиазинам (с K_d для ТФП, равной 500 мкМ, а для хлорпромазина—130 мкМ), независящим от наличия Ca^{2+} . Другой класс центров обладает высоким сродством к фенотиазинам: для ТФП характерно 2 таких центра с K_d —1,5 мкМ, а для хлорпромазина имеется 3 подобных центра с K_d —5 мкМ; связывание фенотиазинов с этим классом центров происходит Ca^{2+} -зависимым способом [10, 15]. W-7 связывается с кальмодулином Ca^{2+} -зависимым способом с K_d , равной 11 мкМ, а алкалоиды винбластин и винкристин связываются с кальмодулином с K_d равной 2 мкМ, также Ca^{2+} -зависимым путем [11, 12].

Недавно проведенные нами исследования [16] показали, что ПФ₁₋₅ связываются как с N-(K_d —15–100 нМ), так и с C-концевыми (K_d —50–1000 нМ) доменами кальмодулина, обладая более высоким сродством к N-концевому домену. Установленная нами первичная структура для 3-х из ПФ₁₋₅ (VVYRW; VVYRW; LVVYRW) [17] дала основание предположить, что эти пептиды связываются с кальмодулином преимущественно через гидрофобные взаимодействия, что типично для многих антагонистов кальмодулина.

Исходя из полученных данных и имеющейся в литературе информации, мы выдвинули следующую гипотезу, объясняющую кооперативный эффект ПФ₁₋₅ и антагонистов кальмодулина на процесс образования иммунокомплекса. ПФ₁₋₅, обладая высоким сродством к N-концевому домену кальмодулина (величина K_d для комплекса N-концевой фрагмент кальмодулина—ПФ меньше, чем величина K_d для комплекса кальмодулин-антагонист кальмодулина), в первую очередь, связываются с ним, вызывая такие конформационные изменения, которые препятствуют связыванию антагонистов кальмодулина с N-концевым доменом. Поэтому мы не наблюдаем активирующего эффекта антагонистов кальмодулина на процесс образования иммунокомплекса, который, как было показано выше, был обусловлен связыванием антагонистов кальмодулина с его N-концевым доменом. Связывание же ПФ₁₋₅ с C-концевым доменом кальмодулина происходит почти одновременно или последовательно с антагонистами кальмодулина. Об этом свидетельствуют близкие величины K_d для комплексов C-концевой фрагмент кальмодулина—ПФ и кальмодулин-антагонист кальмодулина. В результате образуется комплекс кальмодулин-ПФ-антагонист кальмодулина с присущей ему определенной конформацией и в таком модифицированном со-

стоянии молекула кальмодулина изменяет свою чувствительность как к ПФ₁₋₅, так и к его антагонистам.

Известно, что фенотиазины применяются в качестве нейролентиков, W-7 используется в качестве сосудорасширяющего агента [18], а алкалоиды винбластин и винкристин применяются при химиотерапии опухолей [19]. При этом средство всех этих лекарственных соединений к кальмодулину коррелирует с их фармакологической активностью.

Учитывая обнаруженный нами факт изменения чувствительности кальмодулина к его антагонистам под влиянием ПФ₁₋₅, представляется целесообразным проведение фармакологических исследований кооперативного воздействия антагонистов кальмодулина и ПФ₁₋₅ с использованием специфических тестов. Не исключено, что ПФ₁₋₅, изменяя чувствительность кальмодулина к этим лекарственным препаратам, могут найти возможное применение при создании менее токсичных препаратов.

THE CHANGES OF SENSIBILITY OF CALMODULIN AGAINST ITS ANTAGONISTS UNDER THE INFLUENCE OF HYPOTHALAMIC CORONARY CONSTRICTORY PEPTIDE FACTORS

BARKHUDARYAN N. A., BARSEGIAN K. S., AVETISYAN N. A.,
ZAKARYAN T. R., GALOYAN A. A.

И. Сб. Бунятян Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

Using the technique of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) the cooperative influence of calmodulin (CaM-) antagonists and coronar-constrictory peptide factors (PF₁₋₅-) on the formation of CaM-antibody immunocomplex has been investigated.

It has been shown that PF₁₋₅, having higher affinity with CaM, changes the CaM sensibility against its antagonists. CaM antagonists in their place decrease the inhibition of the formation of CaM-antibody immunocomplex under the influence of PF₁₋₅ more than for 45%.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валко К., Закарян Т. Р. Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 519—524, 1988.
2. Бархударян Н. А., Хорват Л., Галоян А. А., Овади Ю. Нейрохимия, т. 9, № 2, с. 190—197, 1990.
3. Horvath L., Barkhudaryan N., Galoyan A., Ovadi J. FEBS Lett., v. 276, № 1—2, p. 197—200, 1990.
4. Barkhudaryan N., Zakaryan T., Aleksanyan A., Sharova N., Shuzh'ova L., Chailyan S., Galoyan A. 8th ESV Meeting, Leipzig, DDR, p. 21, № 4, 1991.
5. Levin R. M., Weiss B. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 213, p. 451—459, 1979.
6. Steiner R. F., Marshall L., Neddeman D. Arch. Biochem. Biophys. v. 246, p. 296—300, 1986.
7. Prozialeck W. C., Weiss B. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 222, p. 509—516, 1982.

8. Weiss P., Prozia'cek W., Cimino M. Adv. Cycl. Nucl. Res., v. 12, p. 213-225, 1960.
9. Moir A. J. G., Ordidge M., Grand R. J. A., Trayer I. P., Perry S.-V. Biochem. J., v. 209, p. 417-426, 1983.
10. Reid R. E., Gariepy J., Hodges R. S. FEBS Lett., v. 154, p. 60-64, 1983.
11. Hidaka H., Yamaki T., Naka M., Tanaka T., Hayashi H., Kobayashi R. Mol. Pharmacol., v. 17, p. 66-72, 1980.
12. Watanabe K., West W. L. Fed. Proc. v. 41, p. 2292, 1982.
13. Drabikowski W., Kuznicki J., Grabarak Z. Biochim. et Biophys. acta, v. 485, p. 124-133, 1977.
14. Querini D., Krebs J., Carafoli E. J. Biol. Chem., v. 259, p. 15172-15177, 1984.
15. Ovadi J. Prog. Drug. Res. v. 33, p. 353-395, 1989.
16. Бархударян Н. А., Орос Ф., Лилиом К., Барсегян К. С., Овади Ю., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 10 № 3-4, с. 155-166, 1991.
17. Бархударян Н. А., Келлерман Я., Логинайх Ф., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 10, № 3-4, с. 146-154, 1991.
18. Nishikawa M., Hidaka H. J. Chlm. Invest., v. 69, p. 1348-1355, 1982.
19. Wilson L. Life Sci., v. 17, p. 303-310, 1975.

Поступила 15. II. 1992

УДК 577.156:612.8.015

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГИОНАЛЬНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н В ЦНС КОШЕК

ВЕРНИГОРА А. Н.,* ГЕНГИН М. Т.,* САВЧЕНКО Р. П.**

*Пензенский госпединститут им. В. Г. Беллинского

**Пензенский институт усовершенствования врачей

Процессинг регуляторных пептидов включает последовательное действие на белки-предшественники различных по специфичности действия пептидгидролаз [1, 2]. На терминальной стадии генеза пептидов вовлекаются пептидгидролазы, катализирующие отщепление с С-конца основных аминокислот [3—5]. Подобный механизм образования характерен для МСГ, инсулина, энкефалинов [2] и других физиологически активных пептидов [2, 6]. Естественно предположить, что уровень тех или иных регуляторных пептидов в определенной степени будет зависеть от состояния ферментов, участвующих в их генезе, и, в особенности, тех пептидгидролаз, которые функционируют на заключительной стадии процессинга. В мозгу крыс обнаружена карбоксипептидаза, отщепляющая аргинин с С-конца проэнкефалинов [7, 8], что дало основание авторам назвать этот фермент «энкефалинконвертазой» [7]. Последние работы, однако, ставят под сомнение адекватность такого названия фермента, поскольку не всегда имеет место корреляция между уровнем активности «энкефалинконвертазы» и содержанием энкефалинов в тех или иных отделах мозга [9]. Высказываются предположения, что карбоксипептидаза Н (К.Ф. 3.4.17.10) («энкефалинконвертаза»), возможно, участвует в генезе и других регуляторных пептидов мозга [10]. Более определенное заключение о роли карбоксипептидазы Н в мозгу на сегодня не представляется возможным в силу недостаточной ее изученности.

Мы изучали распределение карбоксипептидазы Н в различных морфофункциональных структурах ЦНС кошек.

Исследования проводили на половозрелых самцах. Животных декапитировали, быстро извлекали мозг и помещали в предварительно охлажденный 0,25 М раствор сахарозы. Затем мозг тщательно очищали от оболочек и кровеносных сосудов, разделяли на соответствующие отделы и структуры и гомогенизировали в 20 мМ

Na-ацетатном буфере, рН 5,6, в соотношении 1:50 (вес/объем). Гомогенат центрифугировали в рефрижераторной центрифуге в течение 60 мин при 20000 g. Надосадочную жидкость сливали (растворимая фракция), а осадок ресуспендировали в исходном объеме того же буфера (мембраносвязанная фракция).

Активность фермента определяли в гомогенате, растворимой и мембраносвязанной фракциях. Предварительно фракции разбавляли таким образом, чтобы содержание белка в пробе было в пределах 0,3—0,4 мг. Зависимость ферментативной реакции от времени оставалась линейной при содержании белка в пробе в интервале 0,02—0,9 мг и концентрации субстрата 42 мкМ.

Перед определением активности фермента смешивали 350 мкл соответствующей фракции с 50 мкл 10 мМ CoSO_4 , приготовленном на 50 мМ Na-ацетатном буфере, рН 5,6 или 50 мкл того же буфера, не содержащего кобальта (контрольные пробы) и преникубировали 8 мин при 37°. Затем в пробы добавляли 100 мкл раствора субстрата (дансил-Phe-Leu-Ary) в 50 мМ Na-ацетатном буфере, рН 5,6, конечная концентрация субстрата 42 мкМ.

Пробы инкубировали 1 мин при 37°. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 н. HCl . Для экстрагирования продукта реакции (дансил-Phe-Leu) в пробы приливали по 2 мл хлороформа, тщательно встряхивали в течение 40 с и центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Отбирали 1,5 мл хлороформной фазы и измеряли в ней флуоресценцию на ФМЦ—2 при $\lambda=530$ нм. Светофильтр возбуждения— $\lambda=360$ нм.

Активность карбоксипептидазы II определяли по разнице в значениях флуоресценции проб, содержащих кобальт и без кобальта.

Белок определяли по Lowry [11]. Экспериментальный материал обрабатывали статистически [12].

Как свидетельствуют данные, приведенные в таблице, активность карбоксипептидазы II обнаруживается во всех исследованных отделах и структурах ЦНС кошек, однако по величине У. А. эти отделы существенно различаются между собой. Так, минимальная активность характерна для гомогената белого вещества поясничного утолщения спинного мозга (0,081 нМ/мин/мг белка), а максимальная—для гипофиза (9,70 нМ/мин/мг белка).

Активность карбоксипептидазы II в передних и задних корешках обнаруживается на уровне следовых количеств, аналогично распределение по отделам и общей активности фермента. Подобное распределение активности карбоксипептидазы II имеет место и в мозгу крыс [9].

Активность фермента обнаруживается как в растворимой фракции, так и во фракции мембранных структур, однако соотношение растворимой и мембраносвязанной форм различно для отделов ЦНС кошек.

тазы Н в различных отделах и структурах ЦНС кошек (нм/мин 10 мг ткани (1), нМ/мин/мг белка (2), M \pm m, n = 4-6)

я ло ство	Головной мозг								Спинальный мозг				
	мозо- лосто- тел	гипофиз	гипо- таламус	стриа:ум	гиппо- камп	мозже- чок	средний мозг	продолго- ватый мозг	поясничное утолщение			передние корешки	задние корешки
									передние рога	задние рога	белое вещество		
79 \pm 37	0,422 \pm 0,053	13,68 \pm 0,44	0,601 \pm 0,04	0,548 \pm 0,043	0,090 \pm 0,071	0,291 \pm 0,06	0,24 \pm 0,025	0,196 \pm 0,016	0,343 \pm 0,020	0,399 \pm 0,019	0,066 \pm 0,011	\leq 0,019	\leq 0,029
94 \pm 40	0,436 \pm 0,055	9,70 \pm 0,32	0,663 \pm 0,050	0,571 \pm 0,045	0,869 \pm 0,078	0,339 \pm 0,007	0,314 \pm 0,035	0,225 \pm 0,012	0,254 \pm 0,015	0,296 \pm 0,014	0,081 \pm 0,014	\leq 0,019	\leq 0,031
60 \pm 07	0,106 \pm 0,010	6,26 \pm 0,29	0,152 \pm 0,025	0,109 \pm 0,007	0,143 \pm 0,021	0,093 \pm 0,006	0,097 \pm 0,016	0,070 \pm 0,008					
4 \pm 62	0,818 \pm 0,077	10,98 \pm 0,50	0,952 \pm 0,157	0,64 \pm 0,042	0,891 \pm 0,130	0,486 \pm 0,035	0,694 \pm 0,073	0,541 \pm 0,050					
41 \pm 06	0,255 \pm 0,016	5,98 \pm 0,94	0,454 \pm 0,004	0,433 \pm 0,045	0,492 \pm 0,081	0,171 \pm 0,014	0,209 \pm 0,043	0,158 \pm 0,021					
52 \pm 11	0,62 \pm 0,023	7,38 \pm 1,16	0,622 \pm 0,005	0,528 \pm 0,055	0,647 \pm 0,106	0,244 \pm 0,050	0,368 \pm 0,063	0,197 \pm 0,027					

В мозжечке, продолговатом мозгу, сером, белом веществе больших полушарий, мозолистом теле, среднем мозгу соотношение активности в мембраносвязанной фракции к активности в растворимой составляет 2:1. В гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе—3:1, в гипофизе—1:1. Следовательно, за исключением гипофиза, в отделах мозга кошек превалирует мембраносвязанная форма фермента. Величина же У. А. карбоксипептидазы растворимой фракции выше во всех без исключения отделах ЦНС по сравнению с мембраносвязанной фракцией, что объясняется относительно низким содержанием белка в растворимой фракции—примерно 20% от общего его содержания в гомогенатах. При этом также имеет место различие в соотношении У. А. растворимой и мембраносвязанной фракции в зависимости от исследуемых отделов мозга. В мозжечке, продолговатом мозгу, сером, белом веществе больших полушарий, мозолистом теле, среднем мозгу величина У. А. в растворимой фракции выше по сравнению с таковой мембранной фракции примерно в 2 раза, в то время как в гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и гипофизе—не более чем в 1,5 раза.

Анализ полученных результатов позволяет условно разделить исследуемые отделы по активности в них карбоксипептидазы Н на четыре группы в порядке уменьшения активности: 1—гипофиз; 2—гипоталамус, гиппокамп, стриатум, мозолистое тело, серое вещество больших полушарий; 3—мозжечок, средний мозг, продолговатый мозг, белое вещество больших полушарий, серое вещество поясничного утолщения; 4—белое вещество, передние и задние корешки поясничного утолщения.

По соотношению активности фермента в растворимой и мембраносвязанной фракциях исследуемые отделы группируются в основном в том же порядке, что и по активности в гомогенате за исключением мозолистого тела и серого вещества больших полушарий, которые в этом случае попадают не во вторую, а в третью группу. В целом активность фермента выше в отделах, характеризующихся скоплением нейронов и ниже в проводящих путях.

Распределение карбоксипептидазы Н в ЦНС, по-видимому, зависит как от функциональной, так и от структурной организации тех или иных отделов мозга. Высокая активность фермента в гипофизе объясняется тем, что она имеет непосредственное отношение к процессингу секретируемых пептидов этого отдела [8, 9]. Предположение о роли карбоксипептидазы Н в процессинге регуляторных пептидов в таких отделах, как гипоталамус, гиппокамп, стриатум, не лишены основания в силу того, что в них обнаруживается относительно высокое содержание нейропептидов, например, энкефалинов [6, 13].

Таким образом, полученные нами данные подтверждают предположения ряда авторов о том, что карбоксипептидаза Н относится к ферментам процессинга пептидов мозга [7, 10].

REGIONAL DISTRIBUTION OF CARBOXYPEPTIDASE H IN THE CATS CNS

VERNIGORA A. N., GHENGHIN M. T., SAVCHENKO R. P.

State Pedagogical Institute, Penza

Dramatic differences of regional distribution of carboxypeptidase H activity were found in the cat brain and spinal cord. Pituitary gland is characterized by the highest enzyme activity.

Enzyme activities were found to be the smallest in CNS areas containing the fibers bundles. Two forms of enzyme were detected: soluble and membrane-bound forms. The ratios between these two forms were different within CNS areas studied. However membrane-type enzyme activity predominated in all CNS areas.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Hales C. N.* FEBS Lett., v. 94, № 1, p. 10—18, 1978.
2. *Дмитриев А. Д.* Итоги науки и техники, ВИНИТИ, Фармакол. и химиотерапевтические средства. т. 13, с. 7—49, 1982.
3. *Turner A. J.* Trends Neurosci., v. 7, № 7, p. 258—261, 1984.
4. *Григорьянц О. О., Гомазков О. А.* Вopr. мед. химии, т. 32, № 3, с. 15—20, 1986.
5. *Гензин М. Т., Вернигора А. Н.* Укр. биохим. журн. т. 61, № 3, с. 62—66, 1989.
6. *Lunch D. R., Snyder S. H.* Ann. Rev. Biochem., v. 55, p. 773—779, 1986.
7. *Fricke L. D., Snyder S. H.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 79, p. 3886—3890, 1982.
8. *Fricke L. D., Snyder S. H. J.* Biol. Chem., v. 258, p. 10955—10959, 1983.
9. *Supattapone S., Fricke L. D., Snyder S. H. J.* Neurochem., v. 42, № 4, p. 1017—1023, 1984.
10. *Skidgel R. A.* Trends Sci., v. 9, № 8, p. 299—304, 1988.
11. *Lowry O. H., Rosebrough M. J., Farr A. L., Randall R. J.* Biol. Chem., v. 193 № 1, p. 265—275, 1951.
12. *Ойвин Н. А.* Патол физиология и эксперим. медицина, т. 4, № 4, с. 76—85, 1960.
13. *Энкефалины мозга крыс. Распределение и биосинтез.* (Х.—Ю. Т. Янг, Дж. С. Хонг, В. Фратта, Е. Коста/Эндорфины) Под ред. Э. Коста, М. Трабукки, с. 155—164, 1981, М., Мир.

Поступила 4. VI. 1991

Методы исследования

УДК 577.175.522.523

УПРОЩЕННЫЙ МЕТОД ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ И ДОФА
В БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЕ

МАНУХИН Б. Н., СЕЛИВАНОВА Г. П.

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

Описан способ определения концентрации адреналина, норадреналина, дофамина и их предшественника ДОФА в одной биологической пробе, включающей получение флуорофоров аминов. Метод отличается простотой выполнения, обеспечиваемой осаждением белков гомогената 3 М раствором HClO_4 , что исключает дополнительную очистку и связанную с ней неизбежную потерю исследуемых веществ; получением флуорофоров всех четырех веществ одновременно в одной пробе; проведением их количественного определения в одной флуориметрической кювете путем последовательного измерения флуоресценции при оптимальных для каждого вещества длинах волны возбуждения и флуоресценции.

В литературе описано много вариантов метода спектрофлуориметрического определения биогенных моноаминов [1, 2]. Различные варианты основного метода дают хорошо воспроизводимые результаты и широко используются в экспериментальных и клинических исследованиях [3—6].

При изучении адренергической медиаторной системы часто возникает необходимость одновременного исследования всех медиаторов, а иногда и их предшественника 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА), что возможно при использовании спектрофлуориметрических методов. Существенным недостатком последних является трудосмкость исполнения, ограничивающая возможность их применения для серийных рутинных исследований. Затруднения обусловлены необходимостью предварительной очистки биологических проб на адсорбентах или с помощью органических растворителей, а также отдельного получения и измерения флуорофоров норадреналина (НА), адреналина (А), дофамина (ДА) и ДОФА, что чревато неизбежными потерями исследуемых веществ.

В процессе работы с различными вариантами спектрофлуориметрического триоксинидольного метода определения биогенных моноаминов было замечено, что в надпочечниках и семявыносящем протоке катехоламины могут быть определены сразу после осаждения белков, без дополнительной очистки их на адсорбентах. В связи с этим возникло предположение о возможности измерения концент-

рации катехоламинов и в некоторых других тканях за счет улучшения предварительной очистки и дифференцировки флуоресценции исследуемых веществ. Настоящее исследование является экспериментальным доказательством высказанного предположения.

Результаты экспериментов

На рис. 1 и 2 представлены спектры флуоресценции А и НА, где пик возбуждения норадреналина λ 395 нм, флуоресценции— λ 485 нм, а адреналина— λ 420 и 500 нм соответственно. Различия в максимумах возбуждения 25 нм и флуоресценции 15 нм достаточны

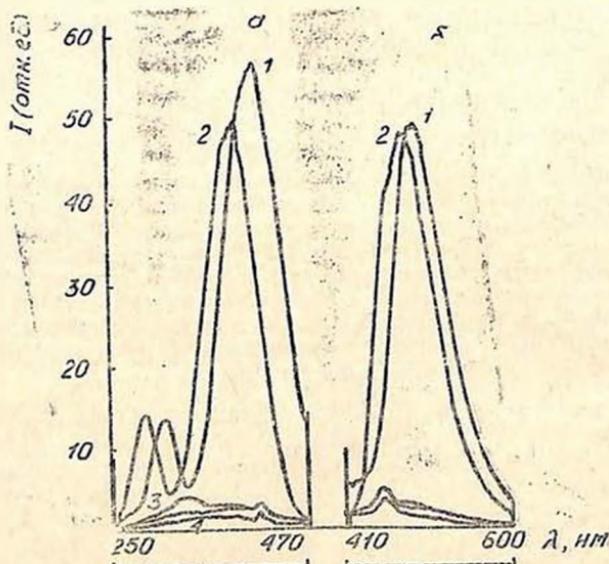


Рис. 1. Спектры волны возбуждения (а) и флуоресценции (б) катехоламинов и ДОФА. а—спектр волны возбуждения при постоянной длине волны флуоресценции 485 нм; б—спектр волны флуоресценции при постоянной длине волны возбуждения 395 нм. 1—норадреналин, 2—адреналин, 3—дофамин, 4—ДОФА (по 100 мкг). Здесь и на рис. 2—4, по оси абсциссе—длина волны возбуждения (а) и флуоресценции (б) в нм, по оси ординат—интенсивность флуоресценции

для их дифференцировки при использовании длин волн возбуждения и флуоресценции, характерных для НА или А. В этих условиях пики флуоресценций ДОФА и ДА практически не отличаются от контроля.

Достоверно различаются также длины волн максимумов возбуждения и флуоресценции ДОФА и ДА (рис. 3, 4). Для ДОФА длина волны возбуждающего света λ 335 нм и флуоресценции 375 нм, ДА—323 и 358 нм соответственно. Различия между макси-

мумом возбуждения ДОФА и ДА—13 нм и флуоресценции—7 нм. В этих условиях флуоресценция А и НА незначительна.

Как видно из рис. 1—4, максимумы возбуждения и флуоресценции у НА и А и ДОФА и дофамина близки, что позволяет проведение дифференцировки между парами этих веществ.

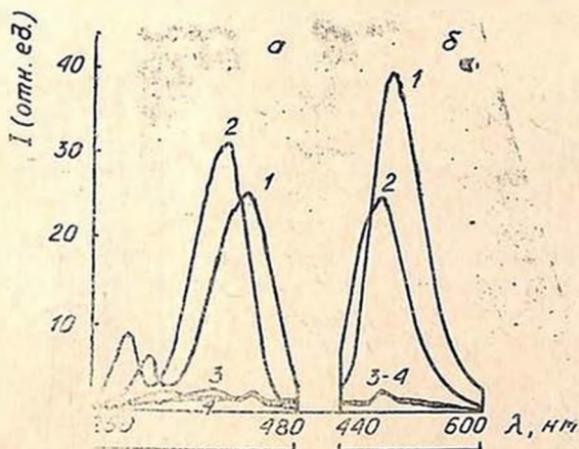


Рис. 2. Спектры волны возбуждения (а) и флуоресценции (б) катехоламинов и ДОФА. а—спектр волны возбуждения при постоянной длине волны флуоресценции 500 нм; б—спектр волны флуоресценции при постоянной длине волны возбуждения 420 нм. 1—адреналин, 2—норадреналин, 3—дофамин, 4—ДОФА (по 100 нг)

Для определения концентрации катехоламинов и ДОФА ткань гомогенизировали в 4 мл 3 М HClO_4 (на этом этапе гомогенат можно хранить в замороженном состоянии длительное время). Гомогенат центрифугировали, к супернатанту добавляли 1,0 мл этанола, смесь нейтрализовали Na_2CO_3 до pH 6,5 (по внешнему индикатору), разливали в пробирки по 1 мл, добавляли по 0,5 мл 25 мМ трис-буфера pH 6,5, затем 1 мл 20 мМ раствора I_2 в 0,3 М KCl , через 3 мин 0,5 мл щелочного сульфита (раствор 500 мг Na_2SO_3 в 5 М NaOH с 1% ЭДТА, готовится ex tempore), а через 5 мин 0,5 мл 8 М уксусной кислоты (до pH 4,5). Пробирки инкубировали в кипящей водяной бане в течение 20 мин, после охлаждения измеряли интенсивность флуоресценции их содержимого при длинах волн возбуждения и флуоресценции, характерных для исследуемых веществ.

При малых количествах ткани и низкой концентрации аминов содержание реагентов и соответственно объем пробы могут быть уменьшены с измерением флуоресценции в микрокубетах.

Количество НА и А в биологической пробе определяли в нг с помощью уравнений:

$$\text{НА} = \frac{F_1 \cdot a_1 - F_2 \cdot a_2}{a_1 \cdot a_1 - a_2 \cdot a_3} \quad \text{А} = \frac{F_2 \cdot a_1 - F_1 \cdot a_3}{a_1 \cdot a_4 - a_2 \cdot a_3} \quad \text{где}$$

F_1 —величина флуоресценции пробы при λ возбуждения 395 нм и λ флуоресценции 485 нм, F_2 —при λ возбуждения 420 нм и λ флуоресценции 500 нм, a —интенсивность флуоресценции 1 нг стандарта НА при флуоресценции (возбуждение 485) 395 нм, a_2 —то же для адреналина при 485/395 нм, a_3 —для норадrenalина при 500/420 нм, a_4 —для адреналина при 500/420 нм.

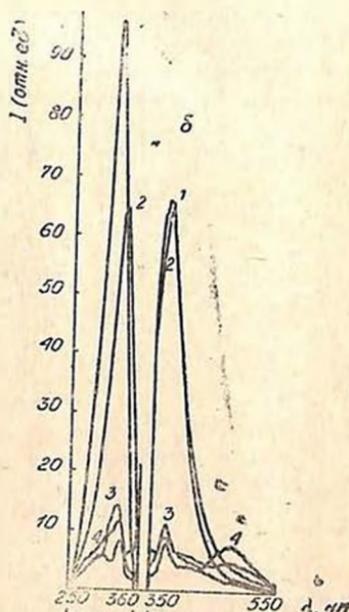
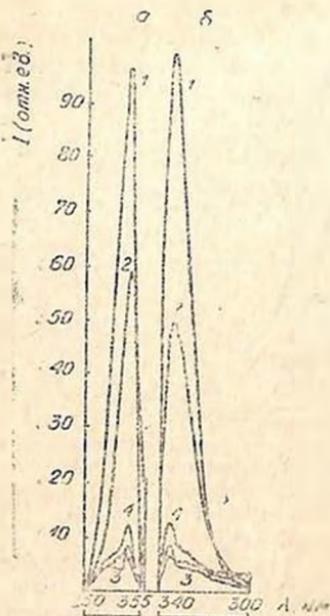


Рис. 3. Спектры волны возбуждения (а) и флуоресценции (б) катехоламинов и ДОФА: а—спектр волны возбуждения при постоянной длине волны флуоресценции 368 нм; б—спектр волны флуоресценции при постоянной длине волны возбуждения 323 нм. 1—дофамин, 2—ДОФА, 3—норадrenalин, 4—адrenalин (по 100 нг)

Рис. 4. Спектры волны возбуждения (а) и флуоресценции (б) катехоламинов и ДОФА. а—спектр волны возбуждения при постоянной длине волны флуоресценции 375 нм; б—спектр волны флуоресценции при постоянной длине волны возбуждения 335 нм. 1—ДОФА, 2—дофамин, 3—норадrenalин, 4—адrenalин (по 100 нг)

Количество ДА и ДОФА (в нг) в биологической пробе определяется с помощью следующих уравнений:

$$\text{ДА} = \frac{F_3 \cdot b_1 - F_4 \cdot b_2}{b_1 \cdot b_3 - b_2 \cdot b_4} \quad \text{ДОФА} = \frac{F_4 \cdot b_1 - F_3 \cdot b_3}{b_1 \cdot b_4 - b_2 \cdot b_3}, \text{ где}$$

F_3 —интенсивность флуоресценции пробы при λ возбуждения 323 нм и λ флуоресценции 368 нм, F_4 —при λ возбуждения 335 нм и λ флуоресценции 375 нм, b_1 —интенсивность флуоресценции 1 нг стан-

дарт DA при λ флуоресценции возбуждения 368/323 нм, b_2 —то же для ДОФА при 368/323 нм, b_3 —для DA при 375/335 нм, b_4 —для ДОФА при 375/335 нм. При отсутствии в исследуемых тканях А и ДОФА расчет концентрации аминов в пробе значительно упрощается: $HA = F_1/a_1$, $DA = F_3/b_1$.

В статье описан способ определения концентрации биогенных мономеров: А, НА, ДА и их предшественника ДОФА в одной биологической пробе, а также получение флуорофоров аминов. В отличие от известных методов разработанный нами способ позволяет с целью упрощения и ускорения процедуры проводить: а) осаждение белков гомогената 3 М раствором $HClO_4$, чем исключается необходимость дополнительной очистки аминов и устраняются потери катехоламинов на этом этапе; б) одновременное получение флуорофоров всех четырех веществ в одной пробирке; в) количественное определение исследуемых веществ в одной флуориметрической кювете путем последовательного измерения интенсивности флуоресценции при оптимальных для каждого вещества длинах волны возбуждения и флуоресценции.

A RAPID, SIMPLE FLUOROMETRIC METHOD FOR SIMULTANEOUS ASSAY OF CATECHOLAMINES AND DOPA IN THE SAME BIOLOGICAL SAMPLE

MANUKHIN B. N., SELIVANOVA G. P.

N. K. Koltzov Institute of the Developmental Biology, Moscow

A method for the epinephrine, norepinephrine, dopamine and their precursor 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA) concentration measurement in the same biological sample that includes the obtaining of amine fluorophores is described. This method differs from the other by: 1) a precipitation of homogenate proteins with 3 M $HClO_4$ excludes the additional purification procedure and the loss of the substances examined; 2) a simultaneous obtaining of fluorophores of all four substances in the same test-tube; 3) a quantitative determination of these substances in the same fluorimetric cuvette by a consecutive fluorescence measurement at the wave lengths of excitation and fluorescence measurement at the wave lengths of excitation and fluorescence optimal for each substance investigated.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Laverly R., Taylor K. M. *Analyt. Biochem.*, v. 22, № 2, p. 289—279, 1968.
2. Atack C. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 451, 99, p. 1977.
3. Манухин Б. Н., Бердышева Л. В., Волина Е. В. *Вопр. мед. химии*, т. 21, № 3, с. 317—321, 1975.
4. Козак Б. М., Печенов Н. В. *Лаб. дело*, № 5, с. 301—303, 1979.
5. Shellenberger M. K., Gordon J. H. *Analyt. Biochem.*, v. 39, p. 356—372, 1971.
6. Manukhin B. N., Volina E. V., Markova L. N., Rakic L., Buznikov G. A. *Development. Neurosc.*, v. 4, p. 322—328, 1981.

Поступила 29. VII. 1991

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

АФФИННАЯ ВЭЖХ КАК МЕТОД АНАЛИЗА РЕГУЛЯЦИИ
АКТИВНОСТИ ФДЭ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ
НА УРОВНЕ МОЛЕКУЛЯРНОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

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

КИРАКОСОВА А. С., ГАЛОЯН А. А.

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

В настоящей работе показано, что кинетические параметры взаимодействия биологически активных соединений и Ca^{2+} -кальмодулинзависимой ФДЭ можно оценить с помощью параметров элюирования этого фермента с аффинных матриц, содержащих иммобилизованные взаимодействующие компоненты. Рассмотрены основные экспериментальные особенности и подходы аналитической аффинной ВЭЖХ с зональным элюированием. Обсуждаются свойства аффинной матрицы и растворенного реагента в отношении их применимости для аналитических экспериментов. Представлены примеры, показывающие возможности рассматриваемого метода для изучения физико-химических параметров взаимодействия биологически активных соединений с Ca^{2+} -кальмодулинзависимой ФДЭ циклических нуклеотидов.

Общей задачей в аффинной ВЭЖХ Ca^{2+} -кальмодулинзависимой ФДЭ является получение иммобилизованного лиганда, сохраняющего способность биоспецифически связывать фермент, находящийся в подвижной фазе. На такой специфичности основаны эффективные методы препаративного выделения этого фермента из сложных смесей, которые могут содержать примеси, близкие по другим свойствам, часто используемым для очистки, таким, как размер и небiosoцифические характеристики поверхности. Аффинная ВЭЖХ может служить не только методом препаративного выделения, но и быть гибким аналитическим методом, так как степень хроматографического удерживания подвижного реагирующего вещества на иммобилизованном лиганде позволяет определять равновесную константу связывания для взаимодействия аффинной матрицы с подвижным компонентом [1, 2]. Кроме того, если в ходе зонального элюирования в подвижную фазу включаются биологически активные вещества, влияние на связывание с аффинной матрицей путем прямого взаимодействия с элюирующим подвижным компонентом (например, вследствие конкуренции с иммобилизованным ФДЭ), то могут быть измерены также параметры взаимодействия этих эффекторов. И поскольку для аффинной матрицы можно варьировать конкурирующие вещества и другие эффекторы, а также химическую природу подвижного аффината, то возможно определение

специфичности связывания и его зависимости от влияния различных биоактивных соединений. Поэтому константы связывания для иммобилизованного лиганда можно сравнить с таковыми для растворимого аналога. Сопоставление взаимодействий в случае аффинной матрицы и раствора может быть использовано для конструирования модели и оценки механизма регуляции ферментативной активности ФДЭ.

Материалы и методы

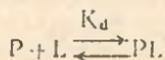
Эксперименты проводили на двухкомпонентной системе ВЭЖХ «Biogonik BT-8100» (ФРГ). Система оснащена инжектором «Rheodyne» с петлей для образца объемом 50 мкл и детектором с изменяемой длиной волны. Спектральный диапазон дейтериевой лампы составлял 190—370 нм. Все растворы постоянно дегазировали гелием 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 PDE-Biosphere, cAMP-Biosphere, cGMP-Biosphere и PDE-Biosphere (4,6×150 мм) «Biosphere» (Армения).

На колонку, предварительно уравновешенную соответствующим буфером, содержащим или не содержащим эффектор, наносили образец (50 мкл). Элюирование продолжали уравнивающим буфером (+/— эффектор) и определяли кривую элюирования первоначально введенного подвижного компонента.

Температура процесса зависела главным образом от стабильности компонентов биоспецифической системы и природы нековалентных взаимодействий между подвижным и иммобилизованным компонентами.

В оптимальных условиях ряд физических параметров колонки, например, скорость потока V_0 (объем элюирования не взаимодействующего, проникающего в поры сорбента вещества, размер молекул которого близок таковому для компонента взаимодействующей системы) и V_m (исключающий объем) остаются постоянными для серии экспериментов с зональным элюированием. Это дает возможность сравнивать результаты большого количества хроматографических анализов и исключает необходимость повторного определения V_0 и V_m . Элюирование в небольших аналитических колонках осуществляли при скорости 0,3—0,5 мл/мин.

Реакцию конкурентного моновалентного связывания можно представить следующей формулой:





где P —подвижный компонент, L' —лиганд, иммобилизованный на матрице, L —растворимый компонент, конкурирующий с иммобилизованным лигандом за связывание с P : PL и PL' —нековалентные комплексы между соответственно подвижными и иммобилизованными компонентами системы: K_d и K_d' для PL и PL' .

Опираясь на уравнение 1 и учитывая общие положения ВЭЖХ с взаимодействующими компонентами, можно вывести следующую зависимость:

$$\frac{1}{V - V_0} = \frac{K_d}{(V_0 - V_m)[L]} + \frac{K_d'[L]}{K_d(V_0 - V_m)[L']} \quad (2)$$

Это выражение устанавливает связь между изменением элюируемого объема элюирования подвижного компонента и концентрациями иммобилизованного и растворимого концентрирующих лигандов L и L' , а также K_d и K_d' . Для систем с моновалентным взаимодействием с помощью уравнения 2 можно определить K_d непосредственно по хроматографическим данным. Для специфической аффинной матрицы с фиксированной концентрацией иммобилизованного лиганда L' проводили ряд экспериментов с изменяющимися значениями L в элюенте. Объемы элюирования зон подвижной макромолекулы определяются при различных значениях L . Строили зависимость $1/(V - V_0)$ от L . Тогда K_d' можно найти по тангенсу угла наклона прямой, а K_d —по отсекаемому отрезку на оси ординат. K_d и K_d' рассчитывали также аналитически, обработав полученные данные по элюированию линейным методом наименьших квадратов.

Важное условие зональной аналитической аффинной ВЭЖХ состоит в том, что концентрация P по мере прохождения зоны через слой адсорбента постоянно изменяется. Поэтому члены, содержащие P , не включаются в выражения, относящиеся к объемам элюирования и K_d . Пренебрежение P допустимо только в том случае, если этот параметр мал по сравнению с K_d . Проведение экспериментов по зональному элюированию при низком P обычно легко осуществимо и особенно желательно при труднодоступных биомолекулах. Использование низких P в зональном анализе аналогично применению низких концентраций фермента в твердофазном ферментативном анализе [3]. Было экспериментально показано [4], что при низком (по отношению к K_d') количестве фермента, введенного в аффинную матрицу, рассчитанные K_d практически не зависят от количества использованного подвижного компонента. В то же время в работе Nichol и соавт. [5] предложены уравнения расчетов по методу постоянного фронтального анализа, в которые входит точное значение концентрации подвижного компонента, нанесенного на аффинную колонку.

Аффинная ВЭЖХ с зональным элюированием может быть также использована для расчетов в системах бивалентного связывания, включая представленные в уравнении 3:

$$\frac{1}{V-V_0} = \frac{K_d'}{(V_0-V_m) [L']} \quad (3)$$

Как описано для систем моновалентного связывания, это уравнение приводит к уравнению 4, позволяющему оценить K_d и K_d' для бивалентных веществ P_2 путем измерения V при различных значениях L . Однако, в отличие от систем моновалентного связывания, для бивалентных систем зависимость $1/(V-V_0)$ от L нелинейна. Таким образом, K_d и K_d' находят по данным конкурентного элюирования путем обработки нелинейной зависимости методом наименьших квадратов. Несмотря на различие, методика для получения данных в случае систем бивалентного связывания полностью аналогична таковой для моновалентной системы:

$$\frac{1}{V-V_0} = \frac{1 + 2 \frac{[L]}{K_d} + \left(\frac{[L]}{K_d}\right)^2}{(V-V_m) \left[2 \frac{[L']}{K_d} + \left(\frac{[L']}{K_d}\right)^2 + 2 \frac{[L][L']}{K_d \cdot K_d} \right]} \quad (4)$$

Если зональное элюирование осуществляется в отсутствие растворимого лиганда ($L=0$), уравнение 4 упрощается. При $V=0$ K_d можно найти непосредственно по объему элюирования при одном зональном элюировании.

Результаты и обсуждение

С использованием аффинной ВЭЖХ с зональным элюированием были изучены взаимодействующие системы ФДЭ-регулятор и ФДЭ-регулятор-регулятор. Ниже приведены несколько типичных примеров, показывающих обычные хроматографические результаты, получаемые при изучении моновалентных, бивалентных и кооперативных взаимодействующих систем.

На рис. 1 представлены результаты, полученные при элюировании зон ФДЭ с cAMP-Biosphere при различных концентрациях растворимого конкурентного лиганда. Линейность зависимости $1/(V-V_0)$ от L отражает 1:1-природу взаимодействия ФДЭ-субстрат; эта зависимость может быть использована для расчета K_d и K_d' с использованием моновалентных моделей (уравнение 2).

Таким образом, этим методом можно установить сразу несколько констант равновесного взаимодействия для ряда конкурентных лигандов и благодаря этому оценить специфичность взаимодействия.

При конкурентном элюировании cGMP-зависимой ФДЭ с cGMP-Biosphere при концентрации лиганда 10^{-4} моль/л (функциональная емкость) в присутствии cGMP зависимость $1/(V-V_0)$ от концентрации растворимого конкурентного лиганда нелинейна

(рис. 2), что согласуется с вероятностью бивалентного связывания субстрата с ферментом. Вследствие этого параметры взаимодействия K_d и K_d' были рассчитаны с использованием многоцентровой модели (уравнение 4). Если ФДЭ элюируется с колонки при концентрации 20 мкМ, изменение объема элюирования при изменении концентрации растворимого лиганда согласуется с моновалентной моделью (рис. 3). В этом случае при уменьшенной плотности связывающих положений матрицы исключается сколь-нибудь значительная возможность одновременного связывания по двум положениям матрицы. Таким образом, как моновалентная, так и бивалентная модели могут быть использованы для расчета значений K_d и K_d' .

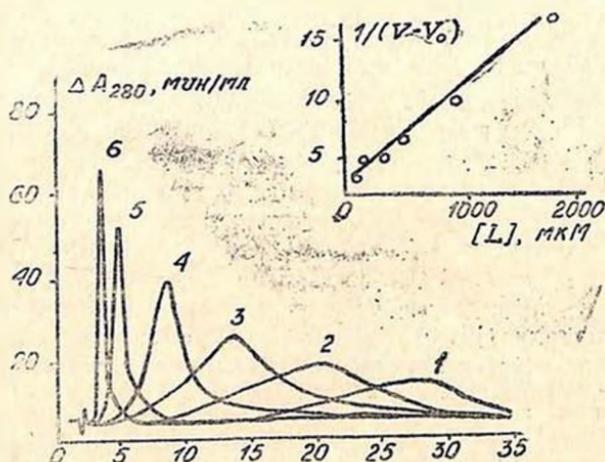


Рис. 1. Аффинная ВЭЖХ с конкурентным зональным элюированием для системы с моновалентным связыванием. Зоны, содержащие равные количества ФДЭ, наносили на колонку cAMP-Biosphere (4,6×150 мм), уравновешенную 25 мМ трис-HCl буфером, pH 7,0, содержащим растворимый конкурентный лиганд cAMP в концентрации (в мкМ): 1—1, 2—10, 3—100, 4—500, 5—1000, 6—2000. Элюирование осуществляли при комнатной температуре со скоростью потока 0,5 мл/мин. Обнаружение продукта при λ 280 нм. Здесь и на рис. 2, 3 по оси абсцисс—объем элюирования в м.л. В правом верхнем углу построена зависимость $1/(V-V_0)$ от концентрации cAMP. Из этого графика с использованием уравнения 2 рассчитана K_d . По оси абсцисс—концентрация cAMP в мкМ.

В то время как элюирование ФДЭ при более высокой концентрации аффинной матрицы приводит к нелинейным зависимостям $1/(V-V_0)$ от L , элюирование при малых концентрациях растворимого лиганда с той же самой матрицы свидетельствует о линейном поведении. Это подтверждает вывод о том, что отклонение от линейности в случае высоких концентраций cGMP на самом деле обусловлено возникающим многоцентровым ФДЭ с cGMP.

Поведение кальмодулина при зональном элюировании с CaM-Biosphere соответствует схеме кооперативного связывания, отличаю-

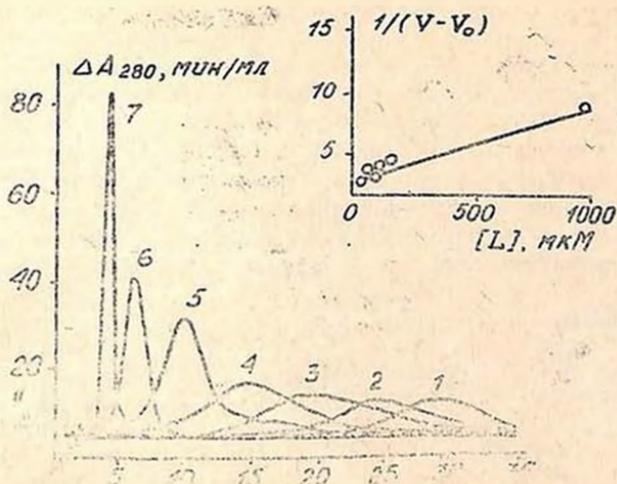


Рис. 2. Аффинная ВЭЖХ с конкурентным зональным элюированием для системы с бивалентным связыванием. Зоны (50 мкл) ФДЭ наносили на колонку сGMP-Biosphere (4.6×150 мм), уравновешенную 25 мМ трис-НСI буфером, pH 7.0, содержащим сGMP в концентрации (п мкМ): 1—1, 2—10, 3—20, 4—50, 5—100, 6—500, 7—1000. Элюирование осуществляли тем же буфером, содержащим указанное количество растворимого лиганда со скоростью потока 0,5 мл/мин при комнатной температуре. Обнаружение продукта при λ 280 нм. В правом верхнем углу построена зависимость $1/(V-V_0)$ от концентрации сGMP в мкМ. K_{m1} рассчитана с использованием уравнения

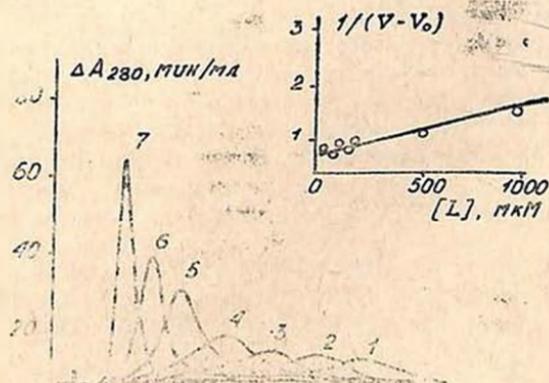


Рис. 3. Конкурентное зональное элюирование комплекса кальмодулин—ФДЭ с сGMP-Biosphere с высоким содержанием конкурентного лиганда. Условия эксперимента аналогичны приведенным на рис. 2. В правом верхнем углу построена зависимость $1/(V-V_0)$ от концентрации сGMP в мкМ

щегося от строго мовалентных и бивалентных моделей. Объемы элюирования обычно уменьшаются с увеличением концентрации антагониста кальмодулина W-7 в элюирующем буфере. Однако, когда полученные при конкурентном элюировании данные были выражены графически как $1/(V-V_0)$ от L , в большинстве случаев наблюдалось отклонение от линейности при низких L (рис. 4). Причина этого поведения объясняется тем фактом, что кальмодулин имеет несколько центров связывания с антагонистами с низким и высоким сродством. Таким образом, в то время как элюирование кальмодулина в отсутствие антагониста отражает аффинное связывание с матрицей,

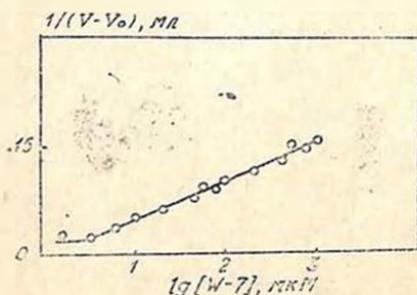


Рис. 4. Линейный график данных конкурентного элюирования кальмодулина с CaM-Biosphere ($4,6 \times 150$). Зависимость $1/(V-V_0)$ от концентрации антагониста кальмодулина W-7 в мкМ. Прямая построена путем обработки экспериментальных данных по методу наименьших квадратов. K_d рассчитана по линейным графикам с использованием уравнений 2 и 3.

элюирование в присутствии низкой концентрации антагониста кальмодулина оказалось более замедленным, чем обычно, что вызвано связыванием W-7 с центрами с высоким сродством. Увеличение низких концентраций антагониста приводит к более плавному уменьшению объемов элюирования, чем ожидалось на основании степени конкурирования W-7 и аффинной матрицы за связывание с кальмодулином, находящимся в растворе.

Таким образом, аналитическая аффинная ВЭЖХ с зональным элюированием была изучена на многих макромолекулярных системах. Было показано, что этот метод достаточно простой в экспериментальном отношении и весьма полезен для оценки взаимодействий ФДЭ и биорегуляторов и позволяет изучить биомолекулярные взаимоотношения и в этой связи молекулярные основы функционирования не только ФДЭ, но многих Ca^{2+} -зависимых ферментов.

AFFINITY HPLC AS A METHOD FOR THE ANALYSIS OF REGULATION OF CYCLIC NUCLEOTIDES PDE ACTIVITY ON THE LEVEL OF MOLECULAR INTERACTION

ABRAHAMIAN G. E., CHAILIAN S. G., ISADJANIAN M. A.,
KIRAKOSOVA A. S., GALOYAN A. A.

H. Ch. Buntatian Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Armenia, Yerevan

In the present investigation it is demonstrated that the kinetic parameters of biologically active compounds interaction with Ca^{2+} -CaM-dependent PDE can be estimated with the parameters of the enzyme elution from the affinity matrix containing the immobilized interacted

components. There are studied the main experimental peculiarities and approaches of analytical affinity HPLC with zonal elution. There are discussed the properties of affinity matrix and of dissolved reagent in reference to their usage for analytical experiments. There are shown the possibilities of the method studied for investigating the physico-chemical parameters of biologically active compounds interaction with Ca^{2+} -CaM-dependent cyclic nucleotides PDE.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Dunn B. M., Chaiken I. M.* Proc. Nat. Acad. Sci USA, v. 71, p. 2382, 1974.
2. *Chaiken I. M.* Anal. Biochem., v. 97, p. 1-10, 1977.
3. *Bender M. L., Brudacher L. J.*—In: Catalysts and Enzyme Action, p. 25-39 N. Y., 1973.
4. *Chaiken I. M., Taylor H. C. J.* Biol. Chem., v. 251, p. 2044-2053, 1978.
5. *Nichol L. W., Ogsston A. G., Winzor D. J., Sawyer W. H.* Biochem. J., v. 143 p. 435-443, 1974.

Поступила 29. VII. 1991

КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКАЯ СИСТЕМА МОЗГА
ПРИ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПОКСИИ

ШИРИНЯН Э. А.

Институт тонкой органической химии им. А. Л. Миджояна НАН Армении, Ереван

В обзоре кратко рассматриваются изменения в головном мозгу синтеза, содержания, обмена, высвобождения и рецепции катехоламинов при гипоксической гипоксии. Приводятся данные об участии катехоламинергической системы мозга в реакциях, обеспечивающих изменение мозгового кровотока и потребления мозгом кислорода при гипоксии. Указываются принципиальные возможности повышения устойчивости мозга к гипоксии воздействием на процессы и структуры, обеспечивающие активность катехоламинергической иннервации.

Головной мозг выделяется среди других органов необычно большой кровообращающей, которая обеспечивает его в постоянном и обильном снабжении кислородом, без которого он может выжить лишь короткое время. Значительная часть поступившего O_2 расходуется в метаболизме глюкозы. Лишь менее 0,1% потребляемого мозгом O_2 утилизируется на прямой синтез и метаболизм катехоламинов (КА) [1], которые, являясь одним из существенных регуляторов адаптивных сосудистых реакций и метаболических процессов [2, 3], играют важную роль в поддержании резистентности и жизнедеятельности мозга в условиях недостатка O_2 [4—6].

Синтез и содержание КА

Одна из первых работ, в которой изучено влияние гипоксии на содержание КА в мозгу, была опубликована Vogl в 1954 г., где показано, что гипоксия вызывает у собак снижение содержания норадреналина (НА) в гипоталамусе [7]. Это наблюдение было подтверждено в 60-х годах Debijadi и соавт. [8]. В дальнейшем были более детально рассмотрены эффекты легкой, умеренной и тяжелой гипоксической гипоксии на синтез, содержание и метаболизм КА как в целом мозгу, так и в его различных областях.

Было выявлено, что при умеренной гипоксии (10% O_2 во вдыхаемом воздухе) уровень НА и дофамина (ДА) в целом головном

мозгу и его отдельных структурах практически не меняется в течение 36 ч экспериментального периода при несколько увеличенном содержании тирозина, наблюдаемом через 24 и 36 ч [9, 10]. Некоторыми авторами не было обнаружено изменений в концентрациях НА и ДА также и при тяжелой гипоксии (5—6% O_2) как в целом мозгу, так и во многих его отделах—большие полушария, мозжечок, гиппокамп [11]. Однако другие исследователи при содержании O_2 в воздухе, равном 8%, через 6 и 12 ч обнаружили небольшое снижение НА в переднем мозгу и его опустошение в гипоталамусе [12]. Об уменьшении содержания НА в гипоталамусе, но не в гиппокампе или обонятельных луковицах сообщают и другие авторы [13—15]. При этом в гипоталамусе и стриатуме ими показано увеличение содержания ДА на 38%. В опытах *in vitro* с инкубацией синапсом мозга в условиях аноксии сдвиги в содержании ДА зависят от рН инкубационной среды: уменьшение—при рН 7,4 и увеличение амина при рН 6,2 [16].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что гипоксическая гипоксия вызывает в большинстве отделов мозга (за исключением гипоталамуса и, по-видимому, некоторых отделов заднего мозга) лишь мягкие изменения в содержании КА, а относительная их стабильность (зависящая также от глубины, продолжительности и скорости достижения гипоксии) не отражает механизма действия гипоксии на адренергическую систему ЦНС. При этом состояние КА-ергической системы мозга и ее регионарные изменения, в основном, обусловлены действием двух разнонаправленных механизмов: с одной стороны—уменьшением синтеза и метаболизма КА, вызванным самой гипоксией и связанным с ингибцией O_2 -зависимых метаболических реакций, с другой—стрессорным воздействием (гипоксическо-гипобарический стресс), приводящим, наоборот, к возрастанию степени оборота и высвобождения медиаторов. В частности, стрессорная постгипоксическая активация КА-ергических нейронов в области мозга с высоким их содержанием [17, 18] приводит к предпочтительно большому возрастанию кровотока в структурах заднего мозга [5, 19] и соответственно к увеличению в них поглощения O_2 [17]. Первоначальное повреждение при гипоксии функций переднего мозга и лишь затем заднего [20], а также отсутствие разницы во всех этих показателях у наркотизированных животных [17, 21] указывает на наличие при гипоксии активирующего КА-ергическую систему компонента и подтверждает возможность неравномерных постгипоксических изменений уровня НА и ДА в различных отделах мозга [6, 15, 22].

Как уже указывалось, сама гипоксия оказывает мощное ингибирующее воздействие на O_2 -зависимые реакции, обеспечивающие синтез и метаболизм КА в мозгу. Так, снижение концентрации O_2 во вдыхаемой смеси (O_2-N_2) от 100 до 5,6% [11] сопровождалось параллельным уменьшением уровня 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА) в различных областях мозга. Подобные результаты получены и при

типобарической гипоксии [15]. При этом наблюдалась четкая корреляция между насыщением артериального гемоглобина кислородом и количеством ДОФА в мозгу крыс. Эти факты становятся объяснимыми в свете данных, что для активации тирозингидроксилазы (фермента, лимитирующего образования КА) требуется молекулярный кислород, который необходим и для вновь образуемой гидроксильной группы ДОФА [23, 24]. С другой стороны, изучение тирозингидроксилазы в опытах *in vitro* и *in vivo* показало, что активность фермента не максимальна даже при нормальном тканевом уровне O_2 , при увеличении которого (или уменьшении pH среды) активность фермента многократно возрастает [16, 25, 26]. Все эти данные предполагают, что угнетение активности тирозингидроксилазы является одной из основных причин снижения биосинтеза КА в мозгу при гипоксии. Это положение доказано в многочисленных исследованиях с введением ингибиторов декарбоксилазы L-ароматических аминокислот (в частности, 5-оксипензилгидразина), в которых показано, что при тяжелой гипоксической гипоксии в целом мозгу и отдельных его участках активность тирозингидроксилазы прогрессивно снижается [11, 26—28]. При этом снижение активности тирозингидроксилазы приводит уже в течение первого часа экспозиции животных в гипоксических условиях (5,6% O_2) к уменьшению степени синтеза НА более чем на 50% [29].

На фоне уменьшения в мозгу содержания ДОФА, а в некоторых регионах и КА, интересен факт повышения при гипоксии уровня тирозина [9]. Известно, что активность фенилаланингидроксилазы чувствительна к НА и подавляется им по механизму обратной связи. Это подавление осуществляется двояко: во-первых, НА является конкурентным ингибитором фермента по отношению к птеридиновому кофактору, во-вторых—неконкурентным по отношению к фенилаланину [30]. Однако при недостатке O_2 ингибирующее действие НА на фенилаланингидроксилазу обоими путями резко ослабляется [30]. В свою очередь, гидроксильрование тирозина модулируется ауторецепторами ДА. Возможность подобной регуляции начальных этапов биосинтеза КА показана в последние годы на срезах стриатума крыс [31].

Многочисленные исследования свидетельствуют о том, что уменьшение биосинтеза КА при гипоксии является следствием не только угнетения активности тирозингидроксилазы. Так, при умеренной гипоксии (10% O_2), на фоне снижения общей интенсивности синтеза моноаминов, подавления активности тирозингидроксилазы не обнаруживается [9], а у животных в раннем постнатальном периоде этот фермент вообще мало уязвим к недостатку O_2 [32]. Эксперименты, проведенные в условиях *in vivo* и *in vitro*, позволили установить, что при гипоксических состояниях отмечается также значительное угнетение активности ДА- β -гидроксилазы. Этот факт постулирован как в мозгу крыс, вдыхающих воздух с 6 или 12%-ным содержанием O_2 [28, 33], так и на инкубируемых при разных pO_2

синапсом, выделенных из гипоталамуса и переднего мозга крыс [34].

Интересно отметить, что инкубация в условиях аноксии синапсом мозга при рН 6,2 (но не 7,4) приводила, наоборот, к двукратной активации синтеза ДА из тирозина, уменьшению K_m для птеридинового кофактора тирозингидроксилазы и увеличению K_i для ДА [16]. Судя по данным японских исследователей, угнетение при гипоксии активности ДА- β -гидроксилазы, имитируемое также ее ингибитором—фузаровой кислотой, является одним из адаптивных для ЦНС механизмов, приводящих к увеличению кортикального кровотока и pO_2 ткани мозга [35].

Угнетение при гипоксической гипоксии активности обеих гидроксилаз не может полностью объясняться лишь уменьшением напряжения O_2 в ткани мозга. Так, при гипоксии уровень O_2 в мозгу через некоторое время адаптивно может восстанавливаться, однако активность гидроксилаз в большинстве областей мозга продолжала оставаться сниженной [1]. С другой стороны, последующая гиперкапния (5% CO_2) или увеличение кислотности среды устраняли тормозящее влияние гипоксии на образование ДОФА и ДА взрослых и новорожденных крыс [16, 32, 36]. При этом синтез НА и ДА возрастал во всех областях мозга, а уровень эндогенного ДА повышался даже при введении животным ингибитора тирозингидроксилазы— α -метил-тирозина [37].

Обобщая сведения об угнетении процессов биосинтеза КА при гипоксической гипоксии, следует отметить, что при этом функция КА-содержащих нейронов, возможно, и не изменяется. Так, вопреки измененным в синтезе КА, при гипоксии нейроны могут высвобождать такое же количество нейромедиаторов, как и при нормальных условиях. Кроме того, последующее нейрональное возбуждение (стресс) может повышать степень синтеза нейромедиаторов в КА-содержащих нейронах [26, 27]. Эти данные оставляют открытым вопрос о биологической значимости зависимости синтеза аминов от наличия O_2 , так как, по мнению некоторых исследователей [38], не имеется убедительных доказательств, что изменения в напряжении O_2 изменяют возбудимость нейрона или его способность влиять на постсинаптические ответы.

Инактивация и скорость обмена КА

Известно, что наряду с угнетением процессов биосинтеза КА, гипоксия приводит и к существенному изменению их метаболизма. Выявлено, что среди основных ферментов, катализирующих реакцию расщепления КА, степень активности MAO является O_2 -зависимым [1, 11, 28]. Так, у крыс при вдыхании воздуха с 6% O_2 [28] или их экспозиции (1 ч) в гипобарических условиях, имитирующих высоту 9000 м [39], происходит более чем 50%-ное снижение активности MAO. При этом ингибируется преимущественно MAO типа А

[40], которая, в отличие от MAO типа B, является внутриклеточным ферментом, обеспечивающим инактивацию моноаминов в цитоплазме нейронов [41]. Об уменьшении активности MAO в митохондриях мозга при гипоксии любого генеза сообщалось Хватовой и соавт. [42], а закономерное и пропорциональное снижение активности фермента в зависимости от тяжести гипоксического воздействия, позволило некоторым исследователям считать активность MAO в мозгу индикатором гипоксического состояния [43].

Следующий фермент, ответственный за инактивацию КА—катехолоксиметилтрансфераза не ингибируется гипоксией. При этом степень образования метоксипродуктов может, в зависимости от условий эксперимента, повышаться, снижаться или вообще не изменяться. Так, после введения ДОФА и ингибции MAO постгипоксическая концентрация 3-метокситирамина в областях мозга богатых DA (например, стриатум) возрастает, что может предотвращаться перерезкой DA-несущих аксонов [28]. О независимости процессов O-метилирования от величины O_2 указывают также данные о накоплении в мозгу норметанефрина и 3-метокситирамина в течение долгого времени после смерти [44].

Дальнейшие исследования, проведенные с помощью ВЭЖХ с электрохимической детекцией, а также фармакологических и изотопных методов определения скорости оборота КА, показали, что в зависимости от исследуемых структур мозга, гипоксия вызывает различной направленности сдвиги в уровнях продуктов инактивации и скорости оборота КА. Так, если в гипоталамусе [15], хвостатом ядре и обонятельных луковицах крыс [45] обнаружено возрастание уровня диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), то в стриатуме [14] и некоторых других областях мозга [15], наоборот, выявлено уменьшение содержания ДОФУК, 3-метокситирамина и гомованилиновой кислоты. При этом суммарное изменение времени оборота КА в целом мозгу [1] не отражало истинной картины обмена НА и DA в различных областях мозга. Так, гипоксия (8% O_2) повышала скорость обмена НА в гипоталамусе, но не в гиппокампе или обонятельных луковицах [13]. Более детальные исследования в НА- и DA-ергических областях мозга позволили выявить, что время оборота НА в гипоталамусе прогрессивно возрастает с увеличением глубины гипобарического воздействия (от «высоты» 3800 до 7000 м). В стриатуме же время оборота DA изменялось двухфазно: уменьшалось при имитировании высоты в 1800 м и резко возрастало—при 5000 и 7000 м [46], хотя в хвостатом ядре и обонятельных луковицах гипоксия уменьшала скорость обмена DA [13]. Различие между временем оборота НА и DA при умеренной гипоксии некоторые авторы [46] объясняют большей чувствительностью к дефициту O_2 DA- β -гидроксилазы, чем тирозингидроксилазы.

Приведенные сведения о состоянии процессов синтеза, превращения и скорости оборота КА при гипоксии позволяют заключить, что относительная стабильность моноаминов в большинстве отделах

мозга объясняется одновременным подавлением их синтетических и метаболических процессов. Подобные сдвиги, по мнению некоторых исследователей [6, 28], играют важную роль в устойчивости ЦНС к гипоксии. Подтверждением этой гипотезы, по крайней мере по отношению к метаболизму ДА, могут быть данные опытов с применением ноотропных средств, которые повышают выносливость головного мозга к гипоксическим воздействиям. В этих исследованиях было показано, что при гипоксии одним из специфических свойств пирацетама, ниритипола и других известных ноотропов энергомобилизующего типа является предупреждение процессов повышения метаболизма ДА в областях мозга, богатых ДА-ергическими нейронами [45].

Высвобождение и захват КА.

Наряду с нарушением биосинтеза и метаболизма КА, гипоксическое воздействие оказывает существенное влияние на процессы высвобождения адренергических медиаторов в различных структурах мозга [47—49]. Так, в опытах на крысах, вдыхающих гипоксическую смесь воздуха (от 5 до 16% O₂), была установлена прямо пропорциональная зависимость между степенью гипоксии и высвобождением ДА из срезов мозга с полосатого тела, индуцируемым электрическим раздражением или K⁺ [49]. При этом если сильно выраженная длительная гипоксия (5% O₂ в течение 8 ч) понижала высвобождение ДА необратимо, то при умеренной (9% O₂) или слабой (16% O₂) гипоксии, вызывающих обратимое понижение высвобождения ДА, возврат к исходному уровню наблюдался лишь через 80 и 120 ч, соответственно. Аналогичные данные получены при исследовании высвобождения ДА из синапсом полосатого тела [50]. Предполагается, что действие гипоксии обусловлено нарушением высвобождения вновь синтезированного ДА [51]. В отличие от индуцируемого высвобождения, спонтанное высвобождение ДА в срезах стриатума морских свинок, подвергнутых острой (5% O₂) гипоксии, быстро увеличивалось [52]. При этом в опытах с экзогенным введением тирозина (50—100 мг/кг, в/б) и галоперидола показано, что высвобождение ДА зависит от уровня тирозина, причем эта зависимость резко увеличивается при истощении нейронов стриатума (6-гидроксидофамином) и контролируется механизмами обратной связи посредством пресинаптических дофаминовых рецепторов [53].

Рядом авторов отмечалось, что при гипоксии степень высвобождения ДА зависит от возраста животных [49]: увеличение—у новорожденных и молодых крыс до полуторамесячного возраста и уменьшение высвобождения—у более взрослых [54]. Учитывая, что молодые животные более устойчивы к гипоксии, чем взрослые [55], можно предположить, что увеличение высвобождения ДА (а также его содержания [14, 15]) в ДА-ергических структурах мозга является одним из основных защитных нейрохимических механизмов,

обеспечивающих жизнедеятельность головного мозга к недостатку O_2 . Так, важная роль ДА-ергического компонента в постгипоксических адаптационных реакциях церебральных сосудов и метаболического обмена подтверждается как данными об увеличении мозгового кровотока и pO_2 при возбуждении (аноморфинном, бромкриптином) дофаминовых рецепторов [56] или имитирования (фузаровой кислотой) гипоксического угнетения активности ДА- β -гидроксилазы [35], так и исследованиями о благоприятных эффектах экзогенно вводимого ДА на церебральное кровообращение, окислительный обмен и потребление O_2 мозгом [57, 58], которые устранялись блокаторами дофаминовых рецепторов [59, 60].

В большинстве работ, посвященных исследованию степени захвата адренергических нейромедиаторов при гипоксических состояниях, выявлено снижение (до 70%) обратного захвата ДА срезами стриатума морских свинок [52], а также ДА и НА синапсосомами мозга мышей песчанок [61]. При этом наиболее чувствителен к недостатку кислорода захват ДА [47]. В синапсосомах полового тела крыс ряд авторов не наблюдали подобного снижения захвата КА [62] или даже, наоборот, обнаружили усиление захвата ДА [63]. Более детальные исследования нейронального захвата ДА, проведенные на модели гипобарической гипоксии, позволили выявить, что гипоксия приводит к длительному (более 10 ч) увеличению числа низкоаффинных участков захвата ДА при одновременном уменьшении высокоаффинных [64]. Авторы считают, что увеличение низкоаффинного захвата ДА при гипоксии является защитным механизмом от повреждающего эффекта экстралеточного ДА, количество которого сразу после прекращения кровообращения и смерти увеличивается более чем в 100 раз [65].

Работы, посвященные выяснению причин нарушения высвобождения и захвата нейромедиаторов мозга, позволили установить, что гипоксическое воздействие вызывает повреждение везикулярных хранилищ НА и, особенно, ДА [49], которое может быть результатом нарушения обмена жирных кислот [60] и перекисидации мембранных фосфолипидов свободными радикалами [66]. Интересно отметить, что уменьшение уровня обратного захвата НА зависит также от постгипоксического снижения активности МАО в мозгу [67].

Адренорецепторы

Известно, что гипоксия, наряду с воздействием на адренергические процессы в центральных КА-содержащих нейронах, оказывает существенное влияние на адренорецепторные структуры и опосредуемые ими цереброваскулярные реакции [68]. При этом выявлено, что среди известных подтипов адренорецепторов чрезвычайно чувствительными к недостатку O_2 являются α -адренорецепторы [38], в частности, их α_2 -популяции. Так, в опытах на крысах показано, что снижение концентрации O_2 во вдыхаемом воздухе до

30 мм рт. ст. приводит к значительной активации реактивности центральных α_2 -адренорецепторов [69, 70]. Наряду с этим нормокапническая гипоксия вызывает значительное увеличение мозгового кровотока [71, 72] и потребления мозгом O_2 [20]. Данные о потенцировании (агонистом α_2 -рецепторов клонидином и гиперкапнией) аналогичных сдвигов мозгового кровотока и реактивности α_2 -адренорецепторов [73, 74], а также о констрикторных эффектах на мозговые сосуды симпатомиметиков НА и ДА [59, 75, 76], с одной стороны, и, наоборот, вазодилатация и увеличение скорости мозгового кровотока при применении α_2 -адреноблокаторов [77] или резком угнетении (6-гидроксидофамином) активности центральной НА-ергической системы [78], с другой,—позволяют предположить, что возбуждение α -адренорецепторов при гипоксии является одним из механизмов, направленных на уменьшение вазодилатации и способствующих усугублению кислородной недостаточности.

На этих положениях основано разрабатываемое в последние годы направление эффективной защиты мозга от гипоксических воздействий посредством блокады α_2 -адренорецепторов их селективными антагонистами. Так, известный α_2 -блокатор идазоксан и ряд оригинальных избирательных блокаторов α_2 -адренорецепторов, синтезированных в ИТОХ АН Армении, значительно увеличивают как выживаемость животных при гипоксической гипоксии [69], так и скорость общего и регионарного мозгового кровотока при одновременном снижении резистентности церебральных сосудов к току крови [79].

Приведенные данные предполагают, что активация центральной НА-ергической системы усугубляет гипоксию мозга и может быть нейтрализована блокаторами α_2 -адренорецепторов.

С точки зрения улучшения мозгового кровообращения и обеспечения мозга O_2 , возможны следующие механизмы действия α_2 -адреноблокаторов при гипоксии: 1) блокада постсинаптических α_2 -адренорецепторов препятствует КА-опосредованному сокращению резистивных сосудов (о содержании в мозговых артериях некоторых видов животных, преимущественно α_2 -адренорецепторов, сообщалось ранее [77]); 2) блокада пресинаптических α_2 -адренорецепторов повышает высвобождение НА [80, 81], которое активирует только вазодилататорные β -адренорецепторы; возможность постгипоксического расширения сосудов β -адренорецепторами [82] при одновременном резком угнетении реакций опосредуемых α_1 -адренорецепторами [83] доказана.

Таким образом, одновременная блокада пре- и постсинаптических α_2 -адренорецепторов может привести к суммации эффектов этих двух механизмов и эффективной защите мозга при гипоксических воздействиях.

THE CATECHOLAMINERGIC SYSTEM OF THE BRAIN DURING HYPOXIC HYPOXIA

SHIRINIAN E. A.

A. L. Mnjoyan Institute of Fine Organic Chemistry, Acad. Sci.
of Armenia, Yerevan

The review briefly analyses the changes in the synthesis, contents, metabolism, release and reception of the brain catecholamines during hypoxic hypoxia. Data concerning the participation of the brain catecholaminergic system in the reactions ensuring modifications in the brain blood flow and the consumption of oxygen by the brain during hypoxia are given. The main possibilities for increasing the resistivity of the brain to hypoxia by acting on the structures and processes responsible for the activity of catecholaminergic innervation are pointed out.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Davis J. N., Carlsson A. J. *Neurochem.*, v. 21, № 4, p. 783-790, 1973.
2. Kobayashi H., Magnoni M. S., Govoni S., Izumi F., Wada A., Trabucchi M. *Experientia*, v. 41, p. 427-433, 1985.
3. Buchwitz E., Weiss H. R. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v. 233, № 2, p. 222-228, 1982.
4. Boismare F., Le Poncin N., Lefrançois J., Le Hacpille L., Marchand J. C. *J. Pharmacol. (Paris)*, v. 8, p. 287-296, 1977.
5. Weiss H. R., Buchwitz-Milton E. *Euro. J. Pharmacol.*, v. 148, № 1, p. 107-113, 1988.
6. Saigaut C., Moore N., Poulin R., Potkin M., Leclerc J. L., Prioux-Guyonseau M., Boismare F. *Aviant. Space Environ. Med.*, v. 52, № 3, p. 166-170, 1981.
7. Vogt M. J. *Physiol. (London)*, v. 123, № 3, p. 451-481, 1951.
8. Debijadj R., Perone L., Varage V., Sissie N. *Aerospace Med.*, v. 40, № 4, p. 495-499, 1969.
9. Davis J. J. *Appl. Physiol.*, v. 2, № 2, p. 215-220, 1975.
10. McNamara M. C., Gingras-Leaherman J., Lawson E. *Dev. Brain Res.*, v. 25, № 2, p. 253-258, 1986.
11. Davis J. N., Carlsson A. J. *Neurochem.*, v. 20, № 3, p. 913-915, 1973.
12. Koob G. F., Anzai Z. *Amer. J. Physiol.*, v. 227, № 1, p. 73-78, 1974.
13. Newby-Smith B., Roberts R. J., Jha-nagar R. K. *Neurotoxicology*, v. 1, № 5, p. 533-540, 1980.
14. Saigaut C., Chretien P., Daoust M., Moore N., Boismare F. *Meth. and Find. Exp. and Clin. Pharmacol.*, v. 8, № 6, p. 343-449, 1986.
15. Trounin J. H., Prioux-Guyonseau M., Cohen Y., Saigaut C. *Gen. Pharmacol.*, v. 17, № 1, p. 69-73, 1986.
16. Pastuszko A., Wilson D., Erecinska M. *Biochem. Pharmacol.*, v. 34, № 16, p. 2975-2982, 1985.
17. Berntman L., Carlsson Ch., Siesjö B. *Stroke*, v. 10, № 1, p. 20-25, 1979.
18. Robbins T. W., Everitt B. J. *Int. Rev. Neurobiol.*, v. 23, p. 303-307, 1982.
19. Neubauer J. A., Edelman N. H. *J. Appl. Physiol.*, v. 57, p. 1303, 1984.
20. Bernthman L., Carlsson C., Siesjö B. *Acta Neurol. Scand.*, v. 56, suppl. v. 64, p. 96, 1977.

21. Weiss H. R., Buchwitz E., Sinha A. K. *Microvasc. Res.*, v. 25, № 2, p. 194—199, 1983.
22. Le Poncin-Laffitte M., Pesquies P. C., Rapin J. R. *Experientia*, v. 36, № 12, p. 1405—1416, 1980.
23. Daly J., Levitt M., Garoff G., Udenfriend S. *Archs. Biochem. and Biophys.*, v. 126, p. 593—598, 1963.
24. Costa E., Neff N. *Handbook of Neurochemistry*, v. 4, p. 45—90, Plenum Press, N. Y., 1970.
25. Fisher D. B., Kaufman S. J. *Neurochem.*, v. 19, № 5, p. 1359—1365, 1972.
26. Paris J. N. J. *Neurochem.*, v. 27, № 1, p. 211—215, 1976.
27. Brown R. M., Snider S. R., Carlsson A. J. *Neural Transm.*, v. 35, № 4, p. 293—305, 1974.
28. Brown R. M., Kehr W., Carlsson A. *Brain Res.*, v. 85, № 3, p. 491—509, 1975.
29. McMillan V. *Can. J. Physiol. and Pharmacol.*, v. 58, № 2, p. 147—152, 1980.
30. Bublitz C. *Biochem. Pharmacol.*, v. 20, № 10, p. 2543—2553, 1971.
31. Sahah R. S., Kuhn D. M., Galloway M. P. *J. Neurochem.*, v. 52, № 5, p. 1517—1522, 1989.
32. Hedner T., Lundberg P., Engel J. *Biol. Neonate*, v. 32, № 3—4, p. 229—236, 1977.
33. Brown R. M., Engel J. *J. Pharm. and Pharmacol.*, v. 25, № 10, p. 815—819, 1973.
34. Katz I. R. *Brain Res.*, v. 331, № 2, p. 397—399, 1982.
35. Oishi M., Go'oh F., Toyoda M., Seki T., Takeoka I., Tarogi S., Niimi T. *Stroke*, v. 10, № 4, p. 407—411, 1979.
36. Hedner T., Lundberg P. *J. Neurochem.*, v. 19, № 1, p. 85—91, 1982.
37. Garsade J., Prous J., Carlsson A., Mena G., Naunyn-Schmied. *Arch. Pharmacol.*, v. 391, № 1, p. 11—15, 1977.
38. Paris J. N., Giron I. T., Stanton E., Maury V. In: *Cerebral hypoxia and its consequences*, p. 219—227, Raven Press, N. Y., 1979.
39. Бродницкая З. Г., Горошинская И. А., Кричевская А. А. Изв. Сев.-Кавказского научн. центра высших школ. Естествен. науки, № 1, с. 77—86, 1982.
40. Горошинская И. А., Бродницкая З. Г., Кричевская А. А., Карабухина Е. Г.: Нейрохимия, т. 1, № 3, с. 282—286, 1982.
41. Youdim M., Riederer P. *Pharmacol. Res. Commun.*, v. 20, suppl. № 4, p. 9—14, 1988.
42. Хватова Е. М., Рубанова Н. А., Жилина И. А. *Вопр. мед. химии*, т. 19, № 1, с. 3—5, 1973.
43. Рубанова Н. А., Фокин В. М., Семенова Т. С., Бобылева Т. Ф., Варыпаева И. С. *Труды Горьков. мед. ин-та*, вып. 63, с. 65—70, 1975.
44. Falman M. D., Myers M. B., Schowen R. L. *Biochem. Pharmacol.*, v. 22, p. 2171—2181, 1973.
45. Funk K. F., Schmidt J. *Blomed. biochem. acta*, v. 43, № 11, p. 1301—1304, 1984.
46. Prioix-Guyonneau M., Cretet E., Jaquet C., Rapin J. R., Cohen Y. In: *Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers. Proc. 4-th Inter. catecholamine symp., California*, v. 1, p. 156—158, 1978.
47. Pastuszko A., Wilson D., Erecinska M. *J. Neurochem.*, v. 38, № 6, p. 1657—1667, 1982.
48. Sauter A., Suter S. *Abstracts of 5-th Catecholamine symposium, Göteborg, Pergamon Press*, p. 271, 1983.
49. Wustmann Ch., Fischer H. D., Schmidt J. *Acta biol. et med. germ.*, v. 41, № 6, p. 571—574, 1982.
50. Gross J., Berndt Ch., Lun A., Gruezmann H., Wustmann Ch., Fischer H. D. *Blomed. biochem. acta*, v. 48, № 2—3, p. 178—192, 1982.
51. Saligaut C., Daoust M., Moore N., Bolsmare F. *Meth. and Find. Exp. and Clin. pharmacol.*, v. 9, № 4, p. 219—224, 1987.
52. Saijoh Kiyofumi, Fujiwara Hiroshi, Tani'aka Chika'ю. *Jap. J. Pharmacol.*, v. 39, № 4, p. 529—539, 1985.

53. *During M. J., Acworth I. N., Wurtman R. J.* Neurochem., v. 52, № 5, p. 1419—1454, 1989.
54. *Gross J., Berndt Gh., Lun A., Wustmann Ch., Fisher H. D.* Biomed. biochim. acta, v. 48, № 2—3, p. 174—177, 1989.
55. *Winston J., Roberts R.* Biol. Neonate, v. 34, № 3—4, p. 199—202, 1978.
56. *Wiersperger N., Gygay P., Meier-Ruge W., Danreisen M.* Bibl. anat., № 18, p. 161—163, 1979.
57. *Гасвый М. Д., Пчелинцева Т. Р., Верещагин В. К., Мигруев Р. Р.* Физиол. журн. СССР, т. 75, № 6, с. 793—797, 1989.
58. *Пчелинцева Т. Р., Погорелый В. Е., Гасвый М. Д.* Фармакология и токсикология, т. 52, № 2, с. 37—40, 1989.
59. *Essen C.* Acta neurol. scand., v. 50, № 1, p. 39—52, 1974.
60. *Ekström-Jodal B., Elverson J., Essen C.* Acta neurol. scand., v. 60, № 1, p. 36—49, 1979.
61. *Domanska-Janik K., Lazarewicz J., Noremborg K., Jalauska T.* Neurochem. Res., v. 10, № 5, p. 649—665, 1985.
62. *Keiz I. J.* Neurochem., v. 38, № 3, p. 859—862, 1982.
63. *Sallgaut C., Daoust M., Moore N., Chretien P., Boismare F.* Circ. et methab. cerveau, v. 2, № 1, p. 33—42, 1984.
64. *Berndt Ch., Dubiel W., Scheuch G., Gross J.* Biomed. biochim. acta, v. 49, № 2—3, p. 221—226, 1989.
65. *Rosselli Zsani L., Pani L., Gessu G. L.* Psychopharmacology, v. 98, № 4, p. 562—563, 1989.
66. *Shmidt J.* Medicamentum., v. 26, № 1, p. 19—21, 1986.
67. *Горошинская И. А., Столяков Т., Мишин Д. В., Мриуля Б. Б.* Вопр. мед. химии, т. 35, № 5, с. 112—115, 1989.
68. *Raiche M. E., Hartman B., Eichling J., Sharpe L.* Proc. Nat. Acad. Sci., USA, v. 72, № 9, p. 3726—3730, 1975.
69. *Ширинян Э. А., Евакян А. Г., Арутюнян С. А., Атаян Т. К., Мирзоян С. А.* Всесоюзн. конф. «Механизмы действия медиаторов и гормонов на эффекторные клетки», Суздаль, с. 319, 1989.
70. *Ширинян Э. А., Мартirosян О. М., Арутюнян С. А., Атаян Т. К.* Физиол. журн. СССР, т. 76, № 9, с. 1197—1202, 1990.
71. *Kissen I., Weiss H.* Amer. J. Physiol., v. 258, № 2, H460—H467, 1989.
72. *Hatter Ch., Kuschinsky W. J.* Appl. Physiol., v. 63, № 6, p. 2208—2215, 1987.
73. *Bryan R., Myers C. L., Page R. B.* Amer. J. Physiol., v. 255, № 2, Pt. 2, R295—R302, 1988.
74. *Cosnier D., Grimal J., Cheule M. J.* Pharmacol., v. 4, № 4, p. 505—513, 1973.
75. *Szabo L., Kovach A., Balosa M., Greenberg J., Revlich M.* Circ. Shock, v. 10, № 2, p. 101—107, 1983.
76. *Medgett L., Hicks P., Langer S.* Eur. J. Pharmacol., v. 135, № 3, p. 443—447, 1987.
77. *Edvinsson L., McKenzie E. T., Robert J., Skarby T., Young A. R.* Acta physiol. scand., v. 123, № 3, p. 317—323, 1985.
78. *Onest S. T., Strauss R., Mayol B., Solomon A.* Brain Res., v. 477, № 1—2, p. 378—381, 1989.
79. *Мартirosян О. М.* Автореферат канд. дисс., Ереван, 1990.
80. *Авакян О. М.* Фармакологическая регуляция функции адrenoрецепторов. М., Медицина, 1988.
81. *Dennis T., L'Heureux R., Carter Ch., Scatton B. J.* Pharmacol. and Exp. Ther., v. 241, № 2, p. 642—649, 1987.
82. *Pequignol J. M., Hellstrom S., Johansson C.* Virchows Arch., A111, № 4, p. 331—336, 1987.
83. *Grant T. L., McGrath J. C., O'Brien J. W.* Brit. J. Pharmacol., v. 85, № 1, p. 69—77, 1985.

Поступила 8. V. 1991

Замеченные опечатки

Страница	Строка	Напечатано	Должно быть
141	2 стр. снизу	Кальмодулины активируют	Кальмодулин активирует
142	19 стр. снизу	на некоторую	на почти
143	3 стр. сверху	50 нМ	50 мМ
143	5 стр. сверху	Ca Cl ₂	Ca Cl ₂
145	20 стр. сверху	величин K ₁	величины K ₁
191	2 стр. сверху	влияя их физико-	влияя на их физико-
204	19 стр. снизу	обмен по-	обмен в по-

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Абрамян Г. Э., Исаджанян М. А., Чаилян С. Г., Кирикосова А. С., Галоян А. А.</i> Анализ параметров взаимодействия синтетического фрагмента (11—19) С-модулина 3 с кальмодулинзависимой ФДЭ циклических нуклеотидов гипоталамуса	131
<i>Барсегян К. С., Бархударян Н. А., Галоян А. А.</i> Исследование воздействия пативных и синтетических коронаросуживающих пептидных факторов на активность кальцинерина	141
<i>Нарсадян Г. К., Адуц Г. Т., Адуц Г. Г., Тер-Татевосян Л. П.</i> Влияние виадата на скорость дефосфорилирования фосфоэфиров в различных отделах нервной системы	150
<i>Шароян С. Г., Моргунян С. С., Арутюнян А. В.</i> Разделение молекулярных форм АМР-дезаминазы из нервной ткани крупного рогатого скота	158
<i>Ерохов П. А.</i> Свойства эндогенного фактора, регулирующего активность Na ⁺ , K ⁺ -АТФазы	166
<i>Нариникова Ф. С., Васильева И. Г., Емельянов В. В., Игнорина С. Л., Васильев А. Н.</i> Активность глутатионредуктазы и глутатионтрансферазы в тканях кроликов в динамике экспериментального сотрясения мозга	174
<i>Аванян А. Е.</i> Высшемомолекулярная фосфокиназа А ₁ из головного мозга крупного рогатого скота. Очистка и некоторые физико-химические свойства	181
<i>Таденосян Ю. В., Асатрян Л. Ю., Карисезян К. Г.</i> Процессы деацелирования мембранных фосфолипидов при фиксации фосфолипидного цикла в синапсоммах крыс и лифтоцитах крови человека	193
<i>Хачатрян Г. С., Адамян М. Х., Антосян А. А., Казарян А. С., Саядян К. С.</i> Содержание различных классов РНК в головном мозгу при действии пирозоловых соединений	202
<i>Априкян В. С., Галоян К. А.</i> Изменение антителообразования в продуктивный период иммунного ответа на различные антигены под влиянием гипоталамических пептидов <i>in vitro</i>	212

Краткие сообщения

<i>Тер-Маркосян А. С., Худавердян Д. П.</i> Влияние паратиреоидного гормона на содержание циклических нуклеотидов в нервной ткани	218
<i>Шандра А. А., Годлевский Л. С., Мазарати А. М., Возчук С. Б., Серасцкий К. Л.</i> Роль факторов пептидной природы в формировании эпилептиформных проявлений при пикротоксининдуцированном клондинге у крыс	222
<i>Бархударян Н. А., Барсегян К. С., Аветисян И. А., Закарян Т. Р., Галоян А. А.</i> Изменение чувствительности кальмодулина к его антагонистам под влиянием коронаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса	228
<i>Вершигора А. Н., Гангин М. С., Сааченко Р. П.</i> Исследование регионального распределения карбоксипептидазы Н в ЦНС кошек	235

Методы исследования

<i>Манухин Б. Н., Селиванова Г. П.</i> Упрощенный метод флуориметрического определения катехоламинов и ДОФА в одной биологической пробе	239
<i>Абрамян Г. Э., Чаилян С. Г., Исаджанян М. А., Кирикосова А. С., Галоян А. А.</i> Аффинизия ВЭЖХ как метод анализа регуляции активности ФДЭ циклических нуклеотидов на уровне молекулярного взаимодействия	244

Обзоры

<i>Ширинян Э. А.</i> Катехоламинергическая система мозга при гипоксической гипоксии	252
---	-----

CONTENTS

<i>Abrahamian G. E., Isadjanyan M. A., Claitian S. G., Kirakosova A. S., Galoyan A. A.</i> The analysis of parameters of the interaction of the synthetic fragment (11—19) of C-modulin 3 with calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase from hypothalamus	131
<i>Barsegian K. S., Barkhudaryan N. A., Ga'oyan A. A.</i> The investigation of the effect of native and synthetic coronarconstrictory peptide factors on Ca^{2+} , calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatase activity	141
<i>Parsadan'yan H. K., Adun's G. T., Adunts G. G., Ter-Tatevosian L. P.</i> The effect of vanadate on the velocity of dephosphorylation of phosphoethers in different parts of nervous system	150
<i>Sharoyan S. G., Mardanian S. S., Haroutjunian A. V.</i> Isolation of AMP-deaminase molecular forms from the cattle nerve tissue	158
<i>Erochov P. A.</i> Properties of endogenic factor regulating the activity of Na^{+} , K^{+} -ATPase	166
<i>Marchenkov F. S., Vasiljeva I. G., Vember V. V., Nagornaya S. L., Vasiljev A. N.</i> Glutathione transferase and glutathione reductase activity in rabbits' brain and liver in dynamics of experimental easy brain injury	174
<i>Ayanian A. Y.</i> A high-molecular-mass phospholipase A_2 from the cattle brain. Purification and some physico-chemical properties	181
<i>Tadevosian Yu. V., Asatrian L. Yu., Karageuzyan K. G.</i> Membrane phospholipid deacylation processes associated with phosphoinositide cycle initiation in rat synaptosomes and human blood lymphocytes	193
<i>Khachatrian G. S., Adamian M. Kh., Antonian A. A., Kazarian A. R., Saydian K. S.</i> The content of various classes of brain RNA under the effect of pyrazole compounds	202
<i>Aprikan V. S., Galoyan K. A.</i> The changes of antibody formation at the productive period of immune response to different antigens under the influence of hypothalamic peptides <i>in vitro</i>	212
Short communications	
<i>Ter-Markosian A. S., Khudaverdian D. N.</i> The effect of parathyroid hormone on cyclic nucleotide contents in neuronal tissue	218
<i>Shandra A. A., Godlevsky L. S., Mazara'i A. M., Vovchuk S. V., Servet'sky K. L.</i> The role of peptide factors in epileptiform activity development under condition of picrotoxin-induced kindling in rats	223
<i>Barkhudaryan N. A., Barsegian K. S., Apetisyan N. A., Zakaryan T. R., Galoyan A. A.</i> The changes of sensibility of calmodulin against its antagonists under the influence of hypothalamic coronary peptide factors	228
<i>Vernigora A. N., Ghenghin M. P., Savchenko R. P.</i> Regional distribution of carboxypeptidase H in the cats CNS	235
Methods	
<i>Manukhin B. N., Selivanova G. P.</i> A rapid, simple fluorometric method for simultaneous assay of catecholamines and DOPA in the same biological sample	230
<i>Abrahamian G. E., Chaityan S. G., Isadjanyan M. A., Kirakosova A. S., Galoyan A. A.</i> Allini y HPLC as a method for the analysis of regulation of cyclic nucleotides PDE activity on the level of molecular interaction	244
Reviews	
<i>Shirtnian E. A.</i> The catecholaminergic system of the brain during hypoxic hypoxia	252