

т.11, №3—4, 1992

ISSN 0203—393X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՂՈՒԽԻՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ

НЕЙРОХИМИЯ
ՆԵՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 11, ВЫП. 3-4

ИЮЛЬ—ДЕКАБРЬ

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЕНИИ
ЕРЕВАН 1992

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

Сдано в набор 19. 06. 1993 г. Подписано к печати 19. 10. 1995 г.
Формат 70X108¹/₁₆ Бумага № 1 «сыктывкарская». Высокая печать.
Печ. лист. 9,0. Усл.-печ. лист. 12,0. Учет.-изд.: 9,85
Тираж 100. Заказ 95. Издат. 8032. Цена 150 драм.
Адрес редакции: 375044, Ереван, ул. П. Севака 5/1.
Издательство АН Армяня, 375019, Ереван, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

А. ЛА ТА (США)—соредактор

Н. Ф. АВРОРА, Г. В. АПРИКЯН, Н. Г. АЛЕКСИДЗЕ, А. В. АРУТЮНЯ

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

К. Г. ҚАРАГЕЗЯН (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. АГАДЖАНОВ, А. Ю. БУДАНЦЕВ, В. А. БЕРЕЗИН, М. А. ДАВТЯН

С. А. ДАМБИНОВА, Н. Н. ДЕМИН, Н. Д. ЕШЕНКО, Б. Н. МАНУХИН,

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

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

Р. Н. ЭТИНГОФ

УДК 547.258.11:612.82]615.9

ВЛИЯНИЕ БИС(И-ТРИБУТИЛОЛОВО) ОКСИДА НА
 Na⁺-ЗАВИСИМОЕ ПОГЛОЩЕНИЕ L[¹⁴C]ГАМК
 СРЕЗАМИ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

РОЗАНОВ В. А., ГЕРАСИМЯК Г. Р., ШАФРАН Л. М.

ВНИИ гигиены водного транспорта МЗ СССР. Одесса

Показано, что бис(и-трибутилолово) оксид (ТБТО) оказывает ингибирующее влияние на поглощение L[¹⁴C]ГАМК (K_m 30 мкМ, $V_{max} = 330$ кмоль/мг⁻¹ ткани/мин⁻¹) срезами коры головного мозга крыс в двух диапазонах концентраций: 10^{-10} — 10^{-8} и 10^{-5} — 10^{-4} М. При концентрации ТБТО 10^{-8} М степень ингибирования не зависела от экспозиции, а при концентрации 10^{-4} М линейно увеличивалась по мере удлинения преникубации срезов с ТБТО от 0 до 30 мин. Предполагается, что ингибирование поглощения ГАМК низкими концентрациями ТБТО обусловлено специфическими взаимодействиями ТБТО с переносчиком ГАМК, в то время как действие больших концентраций опосредовано мембранными эффектами ТБТО и его влиянием на функции Na⁺, K⁺-АТРазы и энергетику нервных клеток.

В последнее время оловоорганические соединения (ООС), широко применяемые в промышленности и обладающие нейротоксическим действием, интенсивно исследуются с позиций нейрехимии. Наиболее хорошо изучены в этом плане триметил- и триэтилолово, проявляющие выраженное нейротоксическое действие по нейроповеденческим, нейроморфологическим и нейрофизиологическим критериям [1]. Анализ данных литературы по этому вопросу свидетельствует, что, наряду с множеством других механизмов, нарушение ГАМК-ергической медиации является одним из существенных компонентов их нейротоксического действия [2]. Значительно менее изучен в этом плане бис(и-трибутилолово)оксид (ТБТО)—наиболее широко распространенный представитель семейства трибутилпроизводных олова [3]. Согласно имеющимся данным, ТБТО, с которым имеют профессионально обусловленный контакт широкие контингенты людей, вызывает поведенческие нарушения [4], а его ближайший гомолог трибутилолово нарушает синтез нейроспецифических белков нервной ткани, имеющих отношение к синапто- и миелиногенезу, особенно у новорожденных животных, и при пренатальном воздействии [5]. В то же время, нейрехимические механизмы токсического действия ТБТО недостаточно изучены. В связи с этим, учитывая упомянутые сведения о влиянии нейротоксичных ООС на систему ГАМК-ергической медиации, мы предприняли настоящее исследование, в котором сконцентрировали внимание на влиянии ТБТО на активный транспорт ГАМК пережн-

вающими срезами мозга. Выбор этого параметра обусловлен данными о влиянии различных металлоорганических соединений на поглощение ГАМК нейроструктурами, что связывают с высокой чувствительностью белковой системы транспорта ГАМК плазматических мембран нервных клеток к тяжелым металлам и их производным [6—8] в силу первостепенной роли SH-групп в реализации транспортного процесса [9].

Материалы и методы

Объектом исследований были крысы-самцы линии *Wistar* массой 150—170 г. Животных декапитировали и дальнейшие операции производили на холоде. Мозг выделяли и бритвой отсекали участок (блоковую полосу) теменной коры размерами $3 \times 6 \times 1$ мм. Эту полоску помещали в заранее приготовленную агар-агаровую ванночку—фиксатор. Срезы толщиной 0,3 мм получали с помощью микротомы МНТ-84 («Микротехника», Пушкино-на-Оке), конструкции Буданцева [10]. 40—60 мг срезов помещали в капроновый мешочек, закрепленный на конце стеклянной трубки, и погружали в термостатированный (37°) инкубационный сосуд объемом 5 мл. Одновременно инкубировали до 8 сосудов. За 5 мин до инкубации и в течение всей инкубации содержимое сосуда насыщали газовой смесью (95% O_2 и 5% CO_2) путем барботажа через нижнее отверстие, снабженное измельчителем пузырьков газа. Инкубационная смесь содержала (в мМ): (NaCl—118, KCl—4,7, глюкозу—11,1, $NaHCO_3$ —25,0, $MgCl_2$ —1,2, NaH_2PO_4 —1,0, $CaCl_2$ —1,3, аскорбат—0,11, ЭДТА- Na_2 —0,04, согласно методическим рекомендациям Agbilla и соавт. [11]. После начала инкубации выдерживали срезы при стандартных условиях в течение 1,5 ч с целью адаптации к новым условиям существования. В предварительных экспериментах оценивали зависимость накопления метки от концентрации добавленной $L[^{14}C]$ ГАМК, времени и температуры инкубации. В первом случае добавляли $L[^{14}C]$ ГАМК в концентрациях 0,5—64 мкМ, во втором случае время инкубации устанавливали в пределах 3—20 мин. Для изучения влияния ТБТО в качестве рабочих параметров выбраны концентрация $L[^{14}C]$ ГАМК 2 мкМ и время инкубации 10 мин. ТБТО вносили в инкубационную среду в 0,02 мл 96°-ного этанола, конечная концентрация которого составляла 60 мМ. Для выявления зависимости «концентрация—эффект» ТБТО добавляли в концентрациях от 10^{-14} до 10^{-4} М с шагом на 1 порядок. После внесения ТБТО преинкубация составляла 10 мин; по окончании преинкубации добавляли $L[^{14}C]$ ГАМК еще на 10 мин, после чего мешочек со срезами извлекали из инкубационного сосуда, промывали холодной инкубационной средой и срезы гомогенизировали в 4 мл 0,005 н. NaOH. Гомогенаты наносили на мишени из нержавеющей стали по 0,5 мл и высушивали при 90° . Контролировали также убыль радиоактивности из инкубационной среды. Выявлена хорошая корреляция

между накоплением и убылью. Подсчет радиоактивности осуществляли на газопоточном счетчике радиоактивности 2154-1-IM («Протока»). Интенсивность накопления ГАМК рассчитывали в пмоль/мг⁻¹ ткани/мин⁻¹.

Результаты и обсуждение

Зависимость накопления метки срезами от концентрации добавленной ГАМК представлена на рис. 1. В диапазоне концентраций добавленной ГАМК 0,5—64 мкМ отчетливо выявляются две системы поглощения—с высоким и низким средством. Достоверно на основании имеющихся данных можно охарактеризовать лишь первую систему: $K_m=30$ мкМ; $V_{max}=330$ пмоль/мг⁻¹ ткани/мин⁻¹. Исходя из данных литературы, первая система может быть отнесена к синаптической системе среднего средства, а вторая, по-видимому, к системе низкого средства [12].

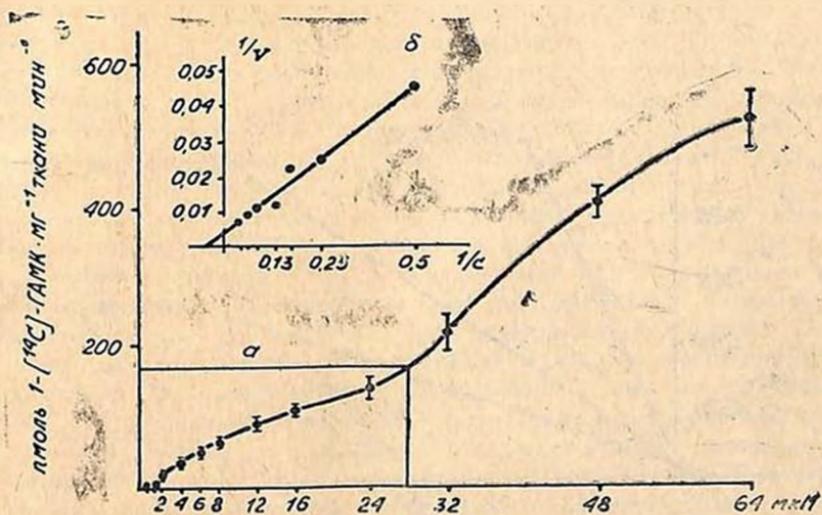


Рис. 1. Зависимость поглощения ГАМК переживающими срезами коры головного мозга крыс от концентрации добавленной ГАМК. Кинетический анализ поглощения с высоким средством.

Линейная зависимость накопления меченой ГАМК (2 мкМ) срезами от времени наблюдается до 10-й мин инкубации, после чего накопление ослабевает и выходит на плато к 20-й мин. Уже к 10-й мин соотношение срез/среда для ГАМК достигает 8—10. Поскольку при заданной концентрации меченой ГАМК накопление идет против градиента концентрации (внутриклеточная ГАМК в нервной ткани, по данным литературы, составляет 2—100 мМ, в зависимости от компартамента клетки [13, 14]), можно говорить об активном транспорте

ГАМК, чем, в частности, свидетельствует также абсолютная зависимость накопления от температуры среды и наличия ионов натрия.

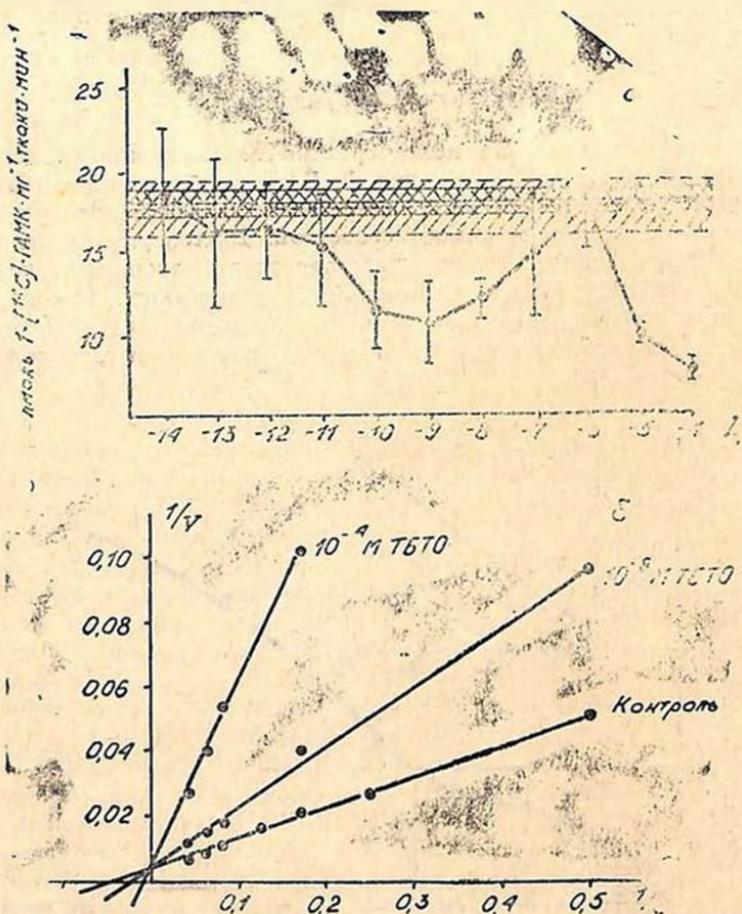


Рис. 2. Влияние различных концентраций бис(н-трибутилтало)оксида на вытеснение ГАМК переживающими срезами коры головного мозга крыс. Кинетический анализ поглощения в диапазонах эффективного ингибирования.

На рис. 2 представлено влияние ТБТО в различных концентрациях на активный транспорт L[¹⁴C]ГАМК в срезы коры головного мозга крыс. Контролем служили срезы, инкубируемые в стандартных условиях в присутствии 60 мМ этанола. Как видно из представленных данных, этанол не оказывал достоверного влияния на поглощение ГАМК срезами. Зависимость «концентрация-эффект» для ТБТО имела нелинейный характер. Наблюдалось достоверное ингибирование

активного транспорта ГАМК в двух диапазонах концентраций ТБТО: 10^{-10} — 10^{-8} и 10^{-5} — 10^{-4} М. В концентрациях ниже 10^{-11} и в области 10^{-7} — 10^{-8} М достоверного влияния ТБТО на поглощение ГАМК не выявлено. В области эффективного ингибирования (10^{-8} и 10^{-4} М ТБТО) проверены кинетические параметры поглощения ГАМК. Выяснилось, что ТБТО в этих концентрациях мало изменяет V_{\max} , но дозозависимо увеличивает K_m (рис. 2), что свидетельствует о конкурентном механизме ингибирования. Таким образом, полученные результаты не исключают конкурентного характера взаимодействия ТБТО и ГАМК на уровне транспортного переносчика. В то же время, наличие двух диапазонов ингибирующих концентраций ТБТО, различающихся на 4 порядка, заставляет предположить участие различных механизмов в реализации ингибирующего действия. Так, поскольку при концентрациях порядка 10^{-5} М для большинства ООС основным в механизме действия *in vitro* является угнетение дыхания и окислительного фосфорилирования [15, 16], можно полагать, что ингибирование поглощения ГАМК срезами при концентрациях ТБТО 10^{-5} М и больше связано с нарушением энергообеспечения активного транспорта. Поэтому особый интерес вызывает факт ингибирования ТБТО поглощения ГАМК при очень низких концентрациях. Можно предположить, что в основе этого ингибирования лежит специфическое взаимодействие ТБТО с переносчиком. Другая возможность развития эффекта связана с мембранотропными свойствами ТБТО, молекула которого отличается выраженной гидрофобностью.

Проведенные исследования по изучению зависимости «время—эффект» подтверждают высказанные предположения. Как видно из рис. 3), при добавлении ТБТО в концентрации 10^{-4} М увеличение экспозиции приводит к достоверному усилению эффекта, в то время как при концентрации ТБТО 10^{-8} М такая зависимость отсутствует. Таким образом, можно выделить два различных механизма действия ТБТО: при низких концентрациях он конкурентно тормозит накопление ГАМК срезами, причем эффект возникает сразу и не усиливается при увеличении контакта с токсикантом, а при высоких концентрациях ингибирование скорее всего обусловлено прогрессирующим угнетением энергопродукции вследствие дезорганизации метаболических процессов и ионного транспорта, зависящим от времени воздействия.

Обсуждая полученные результаты, следует, прежде всего, отметить, что выявленное ингибирующее действие ТБТО при малых концентрациях является новым фактом, который имеет значение для установления порога нейротоксического действия ТБТО с учетом его токсикодинамики в организме, что, в конечном итоге, может быть учтено при обосновании гигиенического регламента на это соединение. Практически все доступные работы, касающиеся влияния различных металлоорганических соединений на поглощение ГАМК срезами мозга, клетками в культуре и синапсоматомами, свидетельствуют о том, что действующие концентрации триэтилсвинца, метилртути, триэтил-, трипропил- и трифенилолова лежат в пределах 10^{-6} — 10^{-4} М.

то есть в области влияния на энергетику клеток [6, 17—19]. В этом плане выявление эффекта значительно более низких концентраций токсиканта представляется существенным. Можно полагать, что в данном случае мы сталкиваемся со специфическим влиянием ТБТО на переносчик ГАМК, возможно, сопряженным с проникновением ТБТО в его гидрофобную часть и модификацией его ориентированных внутрь клеток сульфгидрильных групп при деалкилировании ТБТО, аналогично тому, как это показано для проникающих через мембрану мышьякоорганических соединений, в частности оксида фениларсина [7, 20]. Можно представить, что при дальнейшем повышении концентрации ТБТО на первый план выходят его мембранотропные эффекты, сопровождающиеся влиянием на N^+ , K^+ -АТФазу, как это было отмечено ранее [19], а при больших концентрациях — дезорганизацией метаболизма и снижением энергообеспечения транспортных процессов.

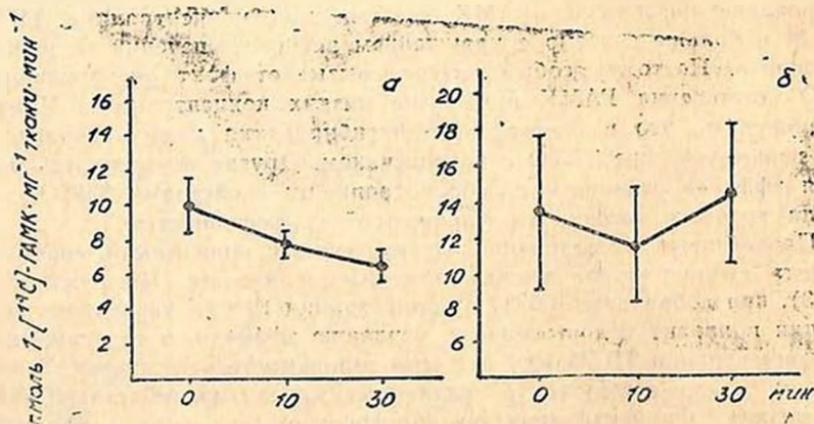


Рис. 3. Влияние длительности преинкубации срезов коры головного мозга крыс с бис(п-трибутилово)оксидом на степень его ингибирующего влияния в диапазонах эффективного ингибирования

В целом полученные данные свидетельствуют о влиянии ТБТО на процессы, связанные с ГАМК-ергической медиацией, что может быть одним из компонентов нейротоксического действия, аналогично его низшим алкильным гомологам.

THE INFLUENCE OF BIS (N-TRIBUTILOLOVO) OXYDES
ON Na⁺-DEPENDENT ABSORPTION OF ¹⁴C GABA BY
THE SECTIONS OF RAT CEREBRAL CORTEX

ROSANOV V. A., GERASIMYAK G. R., SHAFRAN L. M.

ALL-Union Institute of Sci. Res. of Hygiene and Water Transport of the
USSR Ministry of Health, Odessa

It is shown that bis(n-tributylolovo) oxide (TBTO) pays an inhibiting influence on the absorption of 1-¹⁴C l-GABA ($K_m=30 \mu M$, $V_{max}=330 \text{ kmol} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ tissue} \cdot \text{min}^{-1}$) by the sections of rat cerebral cortex in two diapasons of concentrations: 10^{-10} — 10^{-8} and 10^{-5} — 10^{-4} M. At concentration of TBTO 10^{-8} the level of inhibition does not depend on exposition and at concentration 10^{-4} M it increased lineary depending on prolonging the predincubation of the slices with TBTO from 0 to 30 min.

It is supposed that the inhibition of GABA absorption by low concentrations of TBTO depends on specific interaction of TBTO with GABA transmitters, while the effect of great concentrations depends on membrane effect of TBTO and its influence on the function of Na⁺, K⁺-ATPase and energetics of nerve cells.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. McMillan D. E., Wenger G. R. *Pharmacol. Rev.*, v. 37, № 4, p. 365—369, 1985.
2. Розанов В. А., Шафран Л. М. *Нейрохимия*, т. 10, № 1—2, с. 81—93, 1991.
3. Tributyltin compounds, *Environmental Health Criteria*, v. 116, WHO, Geneva, 1990.
4. Crofton K. M., Dean K. F., Bonček V. M., Rosen M. B., Sheets L. P., Chernoff N., Reiter L. W. *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*, v. 97, p. 113—123, 1989.
5. O'Callaghan J. P., Miller D. B. *J. Pharmacol. and Exp. Ther.*, v. 246, № 1, p. 394—402, 1988.
6. Seidman P., Verity M. A. *J. Neurochem.*, v. 48, № 4, p. 1142—1149, 1987.
7. Robillard G. T., Schaaf J. M., Teelken A. W. *FEBS Lett.*, v. 221, № 2, p. 391—395, 1987.
8. O'Kushy J. R., McGeer E. G. *J. Neurochem.*, v. 53, № 4, p. 999—1066, 1989.
9. Troeger M. B., Wilson D. F., Eređinska M. *FEBS Lett.*, v. 171, № 12, p. 303—308, 1984.
10. Буданцев А. Ю.—В кн.: Микротом МНТ-84—срезы нативной ткани—прижизненные исследования на молекулярно-клеточном уровне. Пущино, ИЦБИ АН СССР, 1985.
11. Arbilla S., Kamal L., Langer S. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 57, p. 211—217, 1979.
12. Wood J. D., Sidhu H. S. *J. Neurochem.*, v. 49, № 4, p. 1202—1208, 1987.
13. Сютинский И. А.—В кн.: Гамма-аминомасляная кислота—медиатор торможения. Л., Наука, 1977.
14. Tapia R.—In: *Handb. of Neurochem.*, N. Y.—L.: Plenum Press, v. 3, p. 423—466, 1983.
16. Brody T. M., Moore K. E. *Federat. Proc.*, v. 21, p. 1103—1106, 1961.
16. Loch E. A. *J. Neurochem.*, v. 26, p. 887—892, 1976.
17. Brookes N., Kristi D. A. *J. Neurochem.*, v. 53, № 4, p. 1228—1237, 1989.

18. *Mavfin D. A., Waniewsky R. A., Wolpaw E. W.* Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 71, № 2, p. 155—162, 1983.
19. *Costa L. G.* Toxicol. and Appl. Pharmacol., v. 75, № 3, p. 471—479, 1985.
20. *Schaaf J. M., Teelken G. W., Robillard G. T.* Mol. and Cell. Biochem., v. 82, № 1—2, p. 156, 1988.

Поступила 6. VII. 1991

УДК 616.895.8—092.9—07:616.831—008.94:577.175.523.—02:616.831—008.931:577.152.143

О ВОЗМОЖНОСТИ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОЦЕССОВ,
ПРИВОДЯЩИХ К НАРУШЕНИЮ МЕТАБОЛИЗМА
КАТЕХОЛАМИНОВ ПРИ ШИЗОФРЕНИИ,
НА СТАДИИ БИОСИНТЕЗА НОРАДРЕНАЛИНА

БОЯДЖЯН А. С., МАНУКЯН К. Л., АЙВАЗЯН В. А., ПОГОСЯН А. С.,
КАЗАРЯН Н. П., КАРАГЕЗЯН К. Г.

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван

Показано, что через 1 ч после субокипитального введения крысам антител к дофамин-β-монооксигеназе (не менее 1,2 мкг на 1 кг массы животного) происходит понижение уровня норадреналина и повышение уровня дофамина в ткани головного мозга. Наблюдаемый эффект стабилен в течение 6—12 ч. Как показано несколькими независимыми методами, действие антител является специфичным и не обусловлено цитотоксическим воздействием на клетки мозга. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что наблюдаемый при шизофрении дисбаланс между уровнями норадреналина и дофамина в ЦНС может являться результатом понижения активности дофамин β-монооксигеназы. Обсуждается возможность использования антител к дофамин-β монооксигеназе для моделирования шизофрении.

Одним из основных факторов, индуцирующих шизофрению и различные формы психозов, является резкое возрастание концентрации дофамина (ДА) в пресинаптических окончаниях мозга, приводящее к стойкой блокаде соответствующих рецепторов, вызванное нарушением в ЦНС баланса между норадреналином (НА) и ДА в пользу второго [1—4]. Биосинтез НА из ДА катализирует фермент дофамин-β-монооксигеназа (ДБМ) (КФ 1.14.17.1), локализованный в мозгу в нейросекреторных гранулах окончаний адренергических нейронов; при стимуляции выделения ДБМ вместе с катехоламинами через лимфу высвобождаются в СМЖ и кровь [5]. За последнее время накопился довольно обширный клинический материал [6—8], свидетельствующий о значительном понижении в крови и СМЖ уровней активности ДБМ при указанной патологии, что рассматривается как одна из возможных причин избыточного образования ДА. Является ли пониженный уровень ДБМ у больных шизофренией генетически обусловленным либо это результат развития наблюдаемых при данной патологии аутоиммунных процессов [9, 10], эти вопросы до настоящего времени не выяснены. К сожалению, прямых экспериментальных доказательств повышения уровня ДА в ЦНС как следствия снижения активности ДБМ пока не представлено.

В настоящем исследовании нам удалось воспроизвести наблюдаемый при шизофрении дисбаланс между НА и ДА посредством блокады ДБМ специфическими к ферменту антителами (АТ).

Материалы и методы

В опытах использовали белых крыс-самцов массой 150—200 г и кроликов породы шиншилла массой 1,5—2 кг. Электрофоретически гомогенные препараты ДБМ из мозгового слоя надпочечников быка получали по методу Ljones и соавт. [11]. Иммунизацию кроликов бычьей ДБМ проводили в два этапа (с интервалом 30 дней) введением в подколенный лимфатический узел раствора фермента в 20 мМ калий-фосфатном буфере, рН 6,5 (4 мг в 1 мл), из расчета 0,8 мг белка/1 кг массы животного. Электрофоретически гомогенную фракцию АТ к ДБМ (фракция иммуноглобулинов G, 150 кД) получали из кроличьей антисыворотки посредством осаждения белков сульфатом аммония (40%) и ионнообменной хроматографии на ДЭАЭ-ц (ДЕ-32, «Sigma», США) [12]. Специфичность кроличьей антисыворотки и фракций, содержащих АТ к ДБМ, определяли двойной иммунодиффузией на агаре («Difco», США) [13]. Концентрацию белка определяли методом Lowry и соавт. [14], используя БСА в качестве стандарта. Концентрирование препаратов ДБМ и АТ проводили «сухим» диализом, используя полиэтиленгликоль с величиной M_r 35 кД («Fluka» Швейцария). Раствор АТ (2 мг в 1 мл) в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,5, вводили крысам субокипитально. Ранее было показано, что АТ к бычьей ДБМ кросс-реактивны по отношению к ферменту, выделенному из мозга крыс [15]. Контрольным животным вводили либо буфер без АТ, либо АТ, инактивированные термообработкой (60°, 20 мин); предварительно было установлено, что обработанные таким образом АТ не способны к взаимодействию с ДБМ. Концентрацию НА и ДА определяли методом флуоресцентного анализа [16], предварительно отмыв мозг от крови физиологическим раствором. Получение меченных пиридоксальфосфатом АТ (ковалентная сшивка по ϵ -аминогруппам остатков лизина) проводили следующим образом: АТ (4 мг в 1 мл) инкубировали с 10-кратным молярным избытком пиридоксальфосфата при рН 8,5 в 10 мМ Na_2HPO_4 в течение 1 ч в темноте, после чего добавляли насыщенный раствор боргидрита натрия и доводили рН инкубационной смеси до 7,5 1 М NaH_2PO_4 . Избыток пиридоксальфосфата удаляли гель-фильтрацией на сефадексе G-50 («Pharmacia», Швеция), уравновешенном 10 мМ натрий-фосфатным буфером рН 7,5. Подобная обработка приводит к потере около 30% АТ (вследствие денатурации), что находится в пределах допущений данного метода. Концентрацию включившегося в состав АТ пиридоксальфосфата рассчитывали, исходя из значения коэффициента молярной экстинкции полосы при 334 нм, характерной для пиридоксальфосфата ($E_{334\text{нм}} = 9700 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$). В результате

вышеописанной обработки на 1 молекулу АТ приходилось 5 молекул пиридоксальфосфата. Исследование наличия у АТ к ДБМ возможного цитотоксического воздействия проводили на культуре клеток нейробластомы (субклон N-2а опухоли С-1300). Клетки культивировали на среде Игла с 10%-ной сывороткой крови зародыша крупного рогатого скота (коровы) в присутствии АТ (0,01 мл (2,6 мг/мл) на 1 мл среды). Перед добавлением в среду АТ стерилизовали под воздействием рентгеновских лучей (100 рентген, 15 мин) на установке «РУМБ-26» отечественного производства. Обработанные подобным образом АТ не теряли способность к взаимодействию с ДБМ. В контрольных экспериментах использовали ту же среду без АТ. Эффективность клонирования ($\Sigma_{кл}$) определяли по критерию образования колоний согласно формуле.

$$\Sigma_{кл} = \frac{\text{число колоний}}{\text{число посеянных клеток}} \times 100\% \quad [17]$$

В качестве красителя использовали кристаллический violetовый. Динамику размножения клеток или пролиферативную активность исследовали методом посева равного количества клеток во флаконы Карреля с последующим (через каждые 24 ч) подсчетом их в камере Фукса-Розенталя. Представленные ниже результаты являются средними трех независимых экспериментов (три посева), каждый из которых включал от 15 до 20 параллелей.

Оптические измерения проводили на спектрофотометре «Spekord M-40» (Германия), спектрофлуориметрах «Perkin-Elmer MPF-44A» (Швеция) и «Fagand Optical CO» (США) в кюветках с длиной оптического пути 1 см при комнатной температуре.

Результаты и обсуждение

Как следует из данных, представленных в табл. 1, через 1 ч после субоципитального введения крысам АТ к ДБМ (2,6 мкг АТ/1 г массы животного) происходит резкое снижение в мозговой ткани концентрации НА (практически до нуля) и повышение концентрации ДА (приблизительно в три раза) по сравнению с исходными уровнями этих соединений у контрольных животных. Отмеченное воздействие проявляется при введении не менее 1,2 мкг АТ/1 г массы животного. Максимальный эффект наблюдался при введении 3 мкг АТ/1 г массы животного: более высокие количества АТ не приводили к дальнейшему изменению уровней катехоламинов в мозговой ткани (эффект насыщения). Как следует из данных, представленных на рис. 1, воздействие АТ к ДБМ на уровни НА и ДА стабильно в течение 6—12 ч. Эксперименты с использованием меченных пиридоксальфосфатом АТ к ДБМ показали, что АТ, субоципитально введенные крысам, доходят до ткани мозга. В этих экспериментах через 1 ч после введения АТ крыс декапитировали, мозг промывали физиологическим раствором для удаления крови и гомогенизировали

в 10 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,5, содержащем 0,1%-ный тритон X-100 и 1%-ный NaCl (2 мл буфера/100 мг ткани мозга) в гомогенизаторе Поттера. Гомогенат центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин и осадок вновь подвергли вышеописанной процедуре. Суммарный надосадочный раствор анализировали против того же буфера без тритона, а затем против того же буфера без NaCl. Далее раствор концентрировали до 3 мл и подвергали гель-фильтрации на колонке с сефарозой 6В (1,8×25 см), уравновешенной 10 мМ буфером. В элюируемых с колонки фракциях регистрировали характерное для пиридоксальфосфата оптическое поглощение при 334 нм и интенсивность флуоресценции при 405 нм ($\lambda_{возб} = 334$ нм). Полученные данные показали, что через 1 ч после субокципитального введения меченные пиридоксальфосфатом АТ к ДБМ обнаруживались в белковых экстрактах мозга крыс.

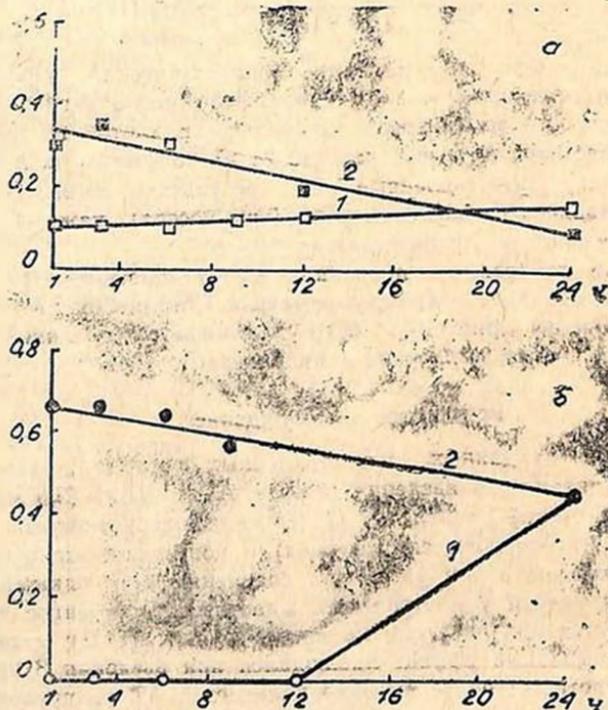


Рис. 1. Зависимость уровней ДА (а) и НА (б) в головном мозгу крыс от времени, прошедшего после введения АТ к ДБМ. 1—контроль. 2—опыт. Каждая точка является средним десяти экспериментов. Концентрация введенных АТ составляет 2,6 мкг на 1 г массы животного. По оси ординат — концентрация норадреналина и дофамина в $\mu\text{кг/г}$ ткани мозга.

Ранее в экспериментах *in vitro* при использовании суспензии хромаффинных клеток нами было показано, что АТ к ДБМ способны

проникать через плазматическую мембрану и мембрану нейросекреторных гранул, доходя таким образом до места локализации фермента и блокируя последний [18]. Аналогичные данные были получены при использовании синаптосом из коры головного мозга быка и кроличьей антисыворотки [19], а также при использовании цельного мозга крыс и АТ к бычьей ДБМ [20]. Таким образом, на основании полученных нами и другими авторами данных можно с достаточной степенью достоверности утверждать, что при субокципитальном введении АТ к ДБМ проходят через ГЭБ в мозговую ткань и доходят до места локализации фермента.

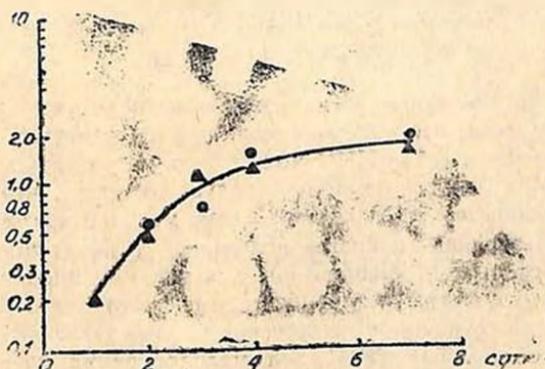


Рис. 2. Динамика размножения клеток нейробластомы в присутствии (▲—▲) и без (●—●) АТ к ДБМ. По оси ординат число клеток $\cdot 10^5$, в логарифмическом масштабе

С другой стороны, нами была исключена возможность неспецифического воздействия АТ на уровни ДА и НА в мозговой ткани, поскольку никаких различий между содержанием этих соединений у контрольных животных в зависимости от того, вводили им буфер без АТ, либо АТ, инактивированные термообработкой, не было выявлено. О специфичности воздействия АТ свидетельствовало также отсутствие линейной зависимости между количеством вводимых АТ и уровнями НА и ДА (эффект насыщения). Кроме того, эксперименты на культуре клеток нейробластомы свидетельствовали об отсутствии у АТ к ДБМ цитотоксической активности, что является еще одним независимым критерием специфичности воздействия АТ. Согласно результатам отмеченных экспериментов $\Sigma_{кл}$ клеток нейробластомы, инкубированных в среде с АТ, практически не отличалась от $\Sigma_{кл}$ контрольных клеток и составляла соответственно 63 и 61%. На рис. 2 показана зависимость роста числа клеток нейробластомы от времени их культивирования в присутствии и без АТ к ДБМ. Как следует из представленных данных, АТ не оказывают существенного влияния на пролиферативную активность клеток.

Таблица

Воздействие АТ к ДБМ на уровни НА и ДА
в головном мозгу крыс

	Концентрация катехоламинов, мкг/г ткани мозга	
	контроль	опыт
НА*	0,35	0,01
ДА**	0,40	1,10

Примечание. *— $p < 0.001$, **— $p < 0.01$.
Концентрация введенных АТ составляет 2.6 мкг
на 1 г массы животного.

Данные, представленные в настоящем исследовании, свидетельствуют в пользу того, что наблюдаемый при шизофрении дисбаланс между уровнями НА и ДА в ЦНС может быть результатом понижения активности ДБМ. С другой стороны, следует отметить, что в настоящее время большинство экспериментальных моделей шизофрении основано на использовании агонистов дофамина (амфетаминовые психозы и т. п.), которые не воспроизводят, в той или иной степени, ни одну из стадий нарушения метаболизма, имеющего место при данной патологии, а лишь отражают ее конечный результат [21]. В этом аспекте, применение АТ к ДБМ для моделирования шизофрении у животных представляется, на наш взгляд, весьма перспективным.

ABOUT THE POSSIBILITY OF MODELING THE PROCESSES RESULT IN THE DISORDER IN CATECHOLAMINE METABOLISM ON THE STATE OF NORADRENALINE BIOSYNTHESIS UNDER THE SCHIZOPHRENIA

BOYAJYAN A. S., MANUKYAN K. L., AIVAZYAN V. A., POGOSYAN A. S.,
KAZARYAN N. P., KARAGEUZYAN K. G.

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

In one hour after the suboccipital injection of antibodies to dopamine- β -monooxygenase into rats (not less than 1,6 $\mu\text{g/g}$ of body weight) the decrease of noradrenaline and the increase of dopamine have been observed. This effect was stable at a period of 6–12 hours. By the use of several independent procedures it has been shown that the influence of antibodies is specific and not connected with cytotoxic effect. The data obtained suggest that a disbalance between dopamine and noradrenaline observed under schizophrenia may be the result of a decrease in dopamine- β -monooxygenase levels. The possibility is discussed about the use of antibodies to dopamine- β -monooxygenase to modeling the schizophrenia.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Hetty L., Berg R., Schlesinger T.* Neurochem. Path., v. 7, p. 221—232, 1987.
2. *Oke A. F., Adams R. N.*, Schizophrenia Bulletin, v. 13, p. 589—604, 1987.
3. *Oke A. F., Adams R. N., Winblad B., VonKnorring L.* Biol. Psychiatry, v. 24, p. 79—82, 1988.
4. *Reynolds G. P.* British Journal of Psychiatry, v. 155, p. 305—316, 1989.
5. *Смир А. Д.* Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов (под ред. Д. М. Патона), М., Медицина, с. 9—21, 1982.
6. *Baron M., Gruen R., Levitt M., Kane S.* Neuropsychobiology, v. 8, p. 312—314, 1982.
7. *Rato M. A., Bagdy G., Blumal F., Perengi A., Richner Z.* Pharmacopsychiatría, v. 16, p. 19—23, 1983.
8. *Markianos M., Rinieris P., Hatzimanolis J., Stefanis C.* Biol. Psychiatry, v. 27, p. 1176—1178, 1990.
9. *Крыжановский Г. Н., Мазаева С. В.* Нейроиммунные процессы в механизмах недепрессивизирующей патологии ЦНС. «Итоги науки и техники» (Иммунология), Москва: ВИНТИ, т. 25, с. 121—169, 1990.
10. *Коляскина Т. Н., Секирина Т. П.* Иммунологические исследования при шизофрении: проблемы и перспективы. «Итоги науки и техники» (Иммунология), Москва: ВИНТИ, т. 25, с. 169—198, 1990.
11. *Ljones T., Skotland T., Flatmark T.* Eur. J. Biochem. v. 61, p. 527—533, 1976.
12. *Гаурюнич Ф.* Иммунохимия и биосинтез антител, М., Мир, 1969.
13. *Ouchterlony D.* Handbook of Experimental Immunology (ed. D. M. Weir), Oxford, p. 655, 1967.
14. *Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
15. *Scotland T., Ljones T.* Inorg. Perspect. Biol. Med., v. 2, p. 151—180, 1979.
16. *Euler U. S., Lishajko F.* Acta physiol. Scand., v. 57, p. 122—132, 1963.
17. *Duncan M., Brooks P.* Mut. Res., v. 21, p. 107—118, 1983.
18. *Boyajian A. S., Karagezyan K. G., Mousesyan A. V., Alexanyan Y. T.* Abstracts of the 19th World Congress ISP—JOCS, September 26—60, Tokyo, Japan, p. 353, 1988.
19. *Docherty M., Bradford H. F., Joh T. H.* FEBS Lett., v. 262, p. 37—4, 1986.
20. *Lipovits Zs., Phexix C., Paull W. K.* Histochemistry, v. 84, p. 105—120, 1986.
21. *Kety S. S.* Fed. Proc., v. 37, p. 2267—2270, 1978.

Поступила 29. IX. 1992

УДК 616—008.939.633.2—02.616—008.931:577.152.311

ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРВИЧНОЙ СТРУКТУРЫ
КАЛЬЦИЙНЕЗАВИСИМЫХ АКТИВАТОРОВ
КАЛЬМОДУЛИНЗАВИСИМЫХ ФЕРМЕНТОВ

ГУРВИЦ Б. Я., АЛЕКСАНЯН С. С., ГАЛЮЯН А. А.

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

Одна из биологически активных фракций, выделенных нами ранее из гипоталамуса быка, являющихся активаторами базальной активности кальмодулинзависимой ФДЭ циклических нуклеотидов, была подвергнута очистке до гомогенного состояния с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ. Определение первичной структуры выделенного соединения показало, что оно представляет собой пептид, состоящий из 14 аминокислотных остатков, совпадающий по структуре с аминокислотной последовательностью фрагмента (72—85) основного белка миелина мозга, за исключением глутамина (72), которому в расшифрованной нами структуре соответствует глутаминовая кислота. Обсуждается вопрос о структурно-функциональных характеристиках выделенного пептида.

Существование эндогенных кальцийнезависимых активаторов ферментов, стимулируемых кальмодулином (КМ) в присутствии Ca^{2+} , заставляет задуматься о физиологической значимости процессов, происходящих с участием КМ. Это ставит под сомнение предположение о том, что КМ является универсальным специфичным регулятором множества реакций, запускаемых при повышении содержания Ca^{2+} в системе, либо в результате повышения чувствительности ферментов к КМ. К таким процессам относится мышечное сокращение, деление клеток, метаболизм циклических нуклеотидов, гликогена и т. д. Различные биологически активные соединения, такие как фосфолипиды, жирные кислоты, пептиды, лекарственные препараты не требуют присутствия Ca^{2+} для проявления своего влияния на КМ-зависимые ферменты [1—4].

Ранее мы обнаружили, что новые кардиотропные соединения, выделенные нами из гипоталамуса быка [5, 6], являются стимуляторами базальной активности КМ-зависимой ФДЭ циклических нуклеотидов, а также некоторых других КМ-зависимых ферментов, в частности протенинкиназы и киназы легких цепей миозина [7—10]. Эти соединения были нами названы С-модулинами.

В настоящее время мы проводим работы по идентификации первичной структуры С-модулинов и их фрагментов. Исследования их

структурно-функциональных характеристик могут являться основой для понимания регуляторных эффектов Ca^{2+} , КМ-зависимых и Ca^{2+} , КМ-независимых модуляторов многих процессов, происходящих в организме.

Материалы и методы

Препарат, содержащий кардиотропные соединения, выделенный из гипоталамуса быка [5, 6], подвергали дальнейшей очистке с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ [8, 10]. Для этого порошок, полученный в результате лиофилизации хлороформ-этанольного экстракта ткани гипоталамуса [5, 6], растворяли в 0,1%-ной трифторуксусной (ТФУ) кислоте, центрифугировали, супернатант фильтровали и фильтрат подвергали хроматографии в системе обратно-фазовой ВЭЖХ на колонке С-8 (Brownlee, Aguarore PP-300, 4,6×220 мм), или на колонке С-18 («Altex», 4,6×250 мм). Элюцию С-модулинов осуществляли с помощью линейного градиента (0—30%) ацетонитрила, содержащего 0,08% ТФУ (буфер Б) в 0,1% ТФУ (буфер А) в течение 60 мин. Фракции, детектированные по УФ-поглощению при 210 нм, собирали, лиофилизировали, затем растворяли их в 50 мМ трис-НСI буфере, рН 8,0, и далее исследовали на предмет их влияния на базальную активность КМ-зависимой ФДЭ циклических нуклеотидов из мозга быка [8, 10]. Фракции I пика, содержащие активатор этого фермента, объединяли, лиофилизировали и подвергали рехроматографии в той же системе с использованием линейного градиента (10%—30% Б) в течение 30 мин со скоростью 0,5 мл/мин на колонке С-8. Секвенирование гомогенного пика, полученного в результате рехроматографии, производили на секвенаторе белков фирмы «Кнауег», ФРГ.

В работе были использованы ацетонитрил фирмы «Merck», ФРГ, ТФУ фирмы «Pierce», США.

Результаты и обсуждение

Ранее мы сообщали о том, что при хроматографии в системе обратно-фазовой ВЭЖХ гипоталамического экстракта были выделены три пика, обладающие способностью стимулировать базальную активность ФДЭ циклических нуклеотидов из мозга быка [7, 8] (рис. 1). Из рис. 1 следует, что скорость гидролиза [^{31}P]сАМР, использованного в качестве субстрата, возрастает в 6—10 раз в присутствии фракций пиков I, II или III, выделенных при ВЭЖХ. Результаты представлены в относительных единицах активности (ОЕА), рассчитанных по проценту гидролизованного субстрата в минуту с учетом соотношения состояния проб в отсутствие фермента и полного гидролиза субстрата в присутствии избытка фермента.

Рехроматография пика 1 выявила один доминантный и два минорных пика, элюируемых при 12,8, 14 и 14,6 Б (рис. 2, а). Доминантная фракция, выделенная при 14% Б при повторной рехроматографии в той же системе элюировалась в виде хроматографически чистого пика (рис. 2, б).

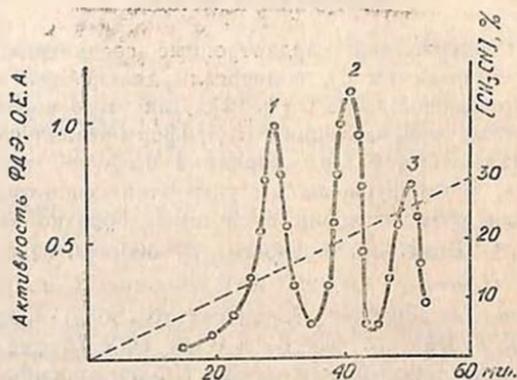


Рис. 1. Профиль активности фосфодиэстеразы циклического АМР в присутствии фракций, выделенных из гипоталамуса быка с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ. Фракции (1 мл) собирали, лиофилизировали, растворяли в 50мМ трис-НСI буфере, рН 8,0, и далее исследовали их влияние на активность фермента (см. Материалы и методы).

Этот пик был подвержен секвенированию. Аминокислотная последовательность, полученная в результате секвенирования, оказалась следующей: Glu-Lys-Ala-Gln-Gly-His-Arg-Pro-Gln-Asp-Glu-Asn-Pro-Val (I). Поиск соответствующей структуры белка с помощью банка данных позволил обнаружить аминокислотную последовательность, которая оказалась фрагментом (72—85) основного белка миеллина (ОБМ) ЦНС, то есть белка миелина A₁: AAQKRPSQRS KYLAS-ASTMD NARHGFLPRH RDTGILDSLG RFFFGSDRGAP KRGSGKDGHH AARTTHYGS� PQKAQGHHPQ DENPV VHFFK NIVTPRTPPP SQGK-

GRGLSL SRFSWGAEQ KPGFGYGGRA SDYKSAHKGL KGHDAQG-TLS KIFKLGGRDS RSGSPMARR (II).

Приведенная структура ОБМ из спинного мозга быка, содержащая 169 аминокислотных остатка, была впервые определена в 1971 году [11]. Фрагмент (72—85) полностью совпадает с определенной нами структурой по всем аминокислотам, за исключением глутамина в позиции 72, которому в нашем случае соответствует глутаминовая кислота. Подобная замена могла произойти в результате дезамидирования глутамина при выделении пептида, поскольку на начальных этапах получения исходного экстракта из тканей гипотала-

муса методика предполагает гомогенизацию свежей ткани в кислой среде (растворе 0,25—0,5%-ной уксусной кислоты) [5, 12]. При этом следует отметить, что в определенной нами структуре имеются еще два глутамина, которые, несмотря на указанную обработку, сохранили свою амидированную форму; они полностью совпадают с позициями 75 и 80 в последовательности ОБМ (структура II). Однако ранее было показано, что дезамидированию подвергаются остатки глутамина и аспарагина, которые соседствуют с остатками основных аминокислот, например, с лизином или аргинином [13]. В нашем случае за глутамином (72) следует именно лизин (73).

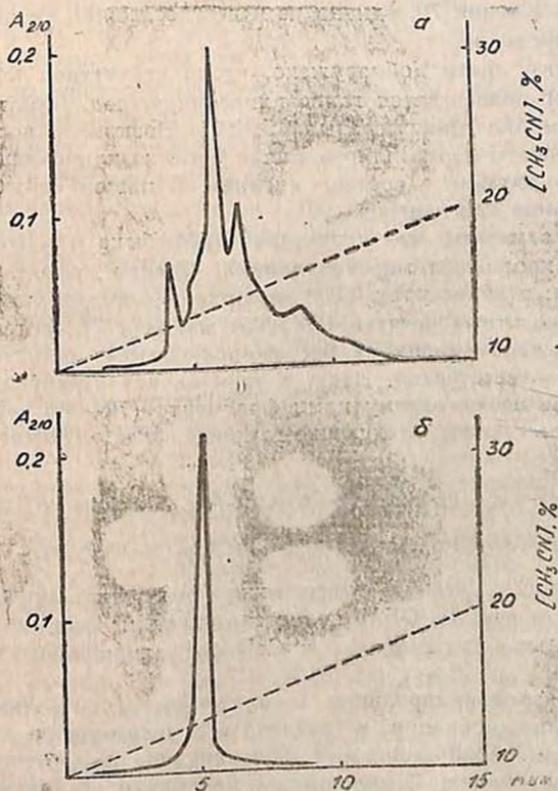


Рис. 2. а. Фракционирование С-модулинов с помощью обратно-фазовой ВЭЖХ. Фракции пика 1 (см. рис. 1) собирали, лиофилизировали, растворяли в 0,1% ТФУ и подвергали ВЭЖХ на колонке С-8 с использованием линейного градиента ацетонитрила в 0,1% ТФУ (10%—30% Б). б. Рехроматография пика С₁ (рис. 2) с помощью ВЭЖХ на колонке С-8

ОБМ является одним из доминирующих структурных белков миелина. Свойства, заложенные в структуре ОБМ, могут определять его функции в качестве акцепторного белка для фосфолипидов. Основные аминокислоты распределены беспорядочно, без какой-либо заметной периодичности, они могут взаимодействовать с фосфатными группами фосфолипидов. В нашем пептиде, содержащем 14 аминокислотных остатков, имеются лизин, гистидин и аргинин, которые могут участвовать в подобном роде взаимодействиях.

ОБМ подвергается также метилированию под действием ферментов мозга и других тканей. Ранее было показано [14], что мишенью является лишь аргинин (106). В пептиде (72—85) имеется аргинин в положении 79, однако не известно, может ли он быть объектом метилирования.

Кроме того, было обнаружено, что в структуре ОБМ остаток треонина (98) подвергается гликозилированию под действием N-ацетилгалактозаминил трансферазы [15, 16]. Возникает вопрос, происходят ли процессы гликозилирования и дегликозилирования ОБМ при его функционировании в составе миелина. В нашем пептиде (72—85) остатки треонина отсутствуют.

Следует отметить, что структура ОБМ быка (1—169) присуща также ОБМ кролика и морской свинки. Однако существуют некоторые различия: в структурах ОБМ кролика и морской свинки отсутствуют аминокислотные остатки Gln (75) и His (77) соответственно, а также обнаружена замена на Ser аминокислотных остатков Ala (74) и Pro (79) соответственно. Итак, в этом случае структуры ОБМ, соответствующие исследуемому нами фрагменту (72—85), представляют собой, соответственно, следующие аминокислотные последовательности:

—Gln-Lys-Ser-Gly-His-Arg-Pro-Gln-Asp-Glu-Asn-Pro-Val- (III)

—Gln-Lys-Ala-Gln-Gly-Arg-Ser-Gln-Asp-Glu-Asp-Pro-Val- (IV)

Подобная замена весьма существенна для структуры белка, поскольку, как известно, ОБМ является одним из лучших субстратов сАМР-зависимых протеникиназ и Ca^{2+} -фосфолипидзависимых протеникиназ.

Участки фосфорилирования в природных субстратах, а также центры фосфорилирования в различных синтезированных пептидах под действием сАМР-зависимых протеникиназ подвергались интенсивному исследованию. Условием осуществления фосфорилирования, естественно, является доступность акцепторов фосфатного остатка—серина или треонина действию фермента. В некоторых случаях белки становились субстратами протеникиназ лишь после денатурации [17] или химической модификации [18]. Участки фосфорилирования формируются также определенными аминокислотными остатками, соседствующими с сериновыми и треониновыми акцепторными остатками. Для установления закономерностей в структуре участков фосфорили-

рования определяли последовательность аминокислот в пептидах, содержащих фосфатный остаток, а также фрагментов белков—продуктов фосфотрансферазной реакции, полученных в результате гидролиза протеолитическими ферментами. В частности, оказалось, что в ОБМ из мозга быка фосфорилированию подвергается серин в положении (12), а в ОБМ мозга крысы—в положении (110). В ОБМ из мозга человека фосфорилируется остаток треонина (34) [19, 20].

Была обнаружена некоторая закономерность, присущая участкам фосфорилирования различных белков (гистонов, тропонина I, протамина, ОБМ). Она заключается в том, что вблизи остатка Ser, подвергающегося фосфорилированию, располагается группа основных аминокислотных остатков—Lis, Arg, His. Это обнаружено, например, на тропонине I из скелетной мышцы [21] и из сердца кролика [22], а также на ОБМ [19, 20].

Структуры приведенных выше фрагментов ОБМ мозга кролика (III) и морской свинки (IV), возможно, подтверждают эту закономерность. Вблизи N-конца остатка Ser в структуре III расположен остаток Lys, в структуре IV—Arg, а вблизи C-конца остатка Ser в структуре III находятся остатки His и Arg. Это превращает пептиды III и IV в весьма вероятные субстраты фосфорилирования под действием сАМР-зависимых протеникиназ. Определенная нами последовательность ОБМ (72—85) не содержит аминокислотных остатков, подвергающихся фосфорилированию. Акцептором фосфатного остатка в молекуле ОБМ мозга (1—169) является Ser в положении 12 [19, 20].

По всей вероятности, пептид (72—85) образовался в результате протеолитического расщепления ОБМ, что позволяет предположить наличие соответствующих протеолитических ферментов в гипоталамусе быка, а также в мозгу кролика и морской свинки. Сопоставление структуры I со структурами III и IV может с большой вероятностью свидетельствовать о том, что пептид с аминокислотной последовательностью I является функционально значимым.

Как было сказано выше, ОБМ фосфорилируется также под действием Ca^{2+} -фосфолипидзависимой протеникиназы [23, 24]. Из числа исследованных белков и пептидов ее лучшими субстратами оказались ОБМ ($K_m=0,3$ мкмоль) и гистон H_1 ($K_m=0,6$ мкмоль). Фосфорилирование под действием этого фермента из сердца быка приводило к включению 5-и и 2-х моль фосфата в первый и второй субстраты соответственно. При этом центры включения фосфатного остатка отличались от тех, которые были найдены при фосфорилировании этих субстратов под действием сАМР-зависимых протеникиназ. Сродство Ca^{2+} -фосфолипидзависимой протеникиназы к ОБМ оказалось в 20 раз больше, чем у сАМР-зависимой протеникиназы. По-видимому, ОБМ является главным физиологическим субстратом Ca^{2+} -фосфолипидзависимой протеникиназы, так как в мозгу активность этого фермента значительно больше, чем в других тканях [25].

Важным фактом явилось обнаружение участия ОБМ в процессе индукции экспериментального аллергического энцефаломиелиита. При определении иммунопатологической роли ОБМ выяснилось, что пептидные фрагменты ОБМ также обладают иммуногенными свойствами [26, 27]. Было показано, что фрагмент ОБМ морской свинки (114—123), включающий остаток Trp, а именно: Phe-Ser-Trp-Gly-Ala-Glu-Gly-Gln-Lys-Pro, является наиболее эффективным из числа исследованных пептидов индуктором болезни. В структуре ОБМ кролика подобным свойством обладают фрагменты (114—123) и (44—89). Аминокислотная последовательность (44—89) содержит участок (68—74), имеющий структурное сходство с фрагментом (114—123). Было обнаружено также, что энцефалогенной активностью обладают и отдельные аминокислоты—триптофан, глутамин и лизин. Следует отметить, что исследуемый нами пептид обогащен в достаточной степени остатками глутамина, глутаминовой кислоты, в его структуру входит также лизин. Подобная структура может определять иммуногенную активность данного пептида.

Весьма вероятно, что при определенных условиях под действием протеаз мозга могут образовываться различные пептидные фрагменты ОБМ, в том числе и пептид, являющийся объектом нашего рассмотрения, обладающие энцефалитогенной активностью. Изучение функциональных свойств подобных пептидов позволит познать патогенез этого заболевания и предложить методы терапии.

При изучении С-модулинподобных нейропептидов с кардиотропной активностью нам удалось выделить также в индивидуальном виде некоторые пептиды, условно названные 15p и 41 p. Вместе с Т. Lee (США) удалось методом масс-спектрального анализа установить их величины M_r , равные 15603, 19875 и 1895 D соответственно. Они не подвергаются эдмановской деградации, что свидетельствует о блокировании N-концевых аминокислот указанных полипептидов. Впервые из так называемого ВПГ—3—4 порошка [5] удалось в индивидуальном виде выделить относительно высокомолекулярные биологически активные белки из гипоталамуса. Удалось также выделить белки с M_r 15749 и 15883 D, которые, вероятно, являются дериватами вещества 41 p.

Учитывая, что вещество 15 p ингибитор ФДЭ сАМР, мы не исключаем возможности, что 15 p является носителем одного из коронарорасширяющих гормонов, ранее изолированных из гипоталамуса (например, нейрогормон С). Однако для подтверждения этого необходимы дополнительные экспериментальные данные.

ON THE INVESTIGATION OF THE PRIMARY STRUCTURE OF CALCIUM-INDEPENDENT ACTIVATORS OF CALMODULIN-DEPENDENT ENZYMES

GURVITS B. Ya., ALEXANYAN S. S., GALOYAN A. A.

H. Kh. Buniyan Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci. of Rep. Armenia, Yerevan

We have previously isolated from bovine hypothalamus few biologically active compounds which proved to be stimulators of the calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase basal activity. One of these stimulators has been purified to homogeneity by reverse phase HPLC. Amino acid sequence analysis established that the sample was indeed a peptide containing 14 amino acid residues, which proved to be an exact match for residues 72—85 of myelin basic protein, with one exception: Glu was found in place of Gln (72). Structure-functional characteristics of this peptide are discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Wolff D. J., Brostrom C. O. Arch. Biochem. and Biophys., v. 173, p. 720—731, 1976.
2. Amar M. S.—In: Cyclic Nucleotides and Therapeutic Perspectives, p. 36—75. Pergamon Press. N° Y., 1978.
3. Wang J. H., Desai R. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 72, p. 926—932, 1976.
4. Karamori T., Creveling C. R., Da'ry J. W. Biochem. et Biophys. acta, v. 582, p. 431—447, 1979.
5. Галоян А. А. Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции, Айтастан, Ереван, 1965.
6. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, p. 769—787, 1986.
7. Галоян А. А., Гурвиц Б. Я. Нейрохимия, т. 5, с. 420—422, 1986.
8. Галоян А. А., Бобрускин И. Д., Гурвиц Б. Я., Лобряян Г. Э. Нейрохимия, т. 8, с. 78—86, 1989.
9. Galoyan A. A., Gurvits E. Ya., Sharova N. P. Neurochem. Res., v. 14, p. 1213—1221, 1989.
10. Galoyan A. A., Gurvits B. Ya., Shvalova L. A., Davis M. T., Shively J. E., Lee T. D. Neurochem. Res., v. 17, p. 773—777, 1992.
11. Eylar E. H., Brostoff S. W., Hashim G., Caccam J., Burnett P. J. Biol. Chem., v. 246, p. 5770—5784, 1971.
12. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 4, с. 109—111, 1962.
13. Robinson A., Mc Karrow J., Cary P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 66, p. 753—760, 1970.
14. Brostoff S. W., Eylar E. H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 68, p. 765—769, 1971.
15. Hagopian A., Eylar E. H. Arch. Biochem. and Biophys., v. 129, p. 515—521, 1969.
16. Hagopian A., Westall F. C., Whitehead J. S., Eylar E. H. J. Biol. Chem., v. 246, p. 2519—2521, 1971.
17. Humble E., Berglund L., Titanji V. et al. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 66, p. 614—621, 1975.
18. Bylund D. B., Krebs E. G. J. Biol. Chem., v. 250, p. 6355—6361, 1975.

19. Carnique P. R., Dunkley P. R., Kemp B. E., Murray A. W. *Nature*, v. 249, p. 147—150, 1974.
20. Carnique P. R., Kemp B. E., Dunkley P. R., Murray A. W. *Biochem. J.*, v. 135, p. 569—572, 1993.
21. Huang T. S., Byland D. B., Stull J. T., Krebs E. G. *Febs lett.*, v. 42, p. 249—252, 1974.
22. Carlson G. M., Bechtel J. P., Graves D. I.—In: *Advances in Enzymol.* (eds. Meister A. et al.), v. 50, p. 41—110, 1979.
23. Takai Y., Kishimoto A., Iwasa Y. et. al. *J. Biol. Chem.*, v. 254, p. 3692—3695, 1979.
24. Wise B. C., Raynor R. L., Kuo J. F. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 8481—8488, 1982.
25. Wise B. C., Glass D. B., Jen Chou C.—H. *J. Biol. Chem.*, v. 257, p. 8489—8495, 1982.
26. Eylar E. H., Salk J., Beveridge G., Brown L. *Arch. Biochem. and Biophys.*, v. 132, p. 34—42, 1969.
27. Westall F., Robinson A., Caccam J., Jackson J., Eylar E. H. *Nature*, v. 229, p. 22—27, 1971.

Поступила 27. VII. 1992

УДК 577.171.59.175.3/7

ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ ПОВЫШАЮТ
АНТИГЕНПРЕДСТАВЛЯЮЩУЮ ФУНКЦИЮ МАКРОФАГОВ

АПРИКЯН В. С., ГАЛОЯН К. А.

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

Исследовали влияние гипоталамических пептидов на антигенпредставляющую функцию мышинных перитонеальных макрофагов.

Установили, что исследуемые пептиды потенцируют данный иммунологический феномен. Они повышают антигенспецифическую, макрофагзависимую Т-клеточную пролиферацию *in vitro*, а также продукцию и секрецию фактора роста Т-клеток — интерлейкина-2 в культуре клеток CTLL-2. Наиболее активные дозы действовали в физиологических концентрациях 10^{-8} — 10^{-12} мкг.

Антигенпредставляющая функция макрофагов является одной из основных иммунологических функций данного класса иммунокомпетентных клеток [1, 2]. Эффективность этого феномена, как известно, зависит от процесса переработки антигенных детерминант и их представления в соединении с продуктами главного комплекса гистосовместимости (МНС) Т-клеткам [3, 4]. Однако до настоящего времени, как сигналы, так и их инициаторы, модулирующие процессы переработки и представления антигена, индуцированные и запущенные в макрофагах, остаются в большей степени неизвестными. Для выяснения механизмов активации макрофагов были использованы иммуномодуляторы из различных источников, такие как продукт ферментативного расщепления иммуноглобулинов, фрагмент тяжелой цепи IgG, тетрапептид тафтени [5, 6], представители семейства полипептидов, выделенных из тимозина фракции 5, тимозины α_1 и β_1 [7]. Интересным, на наш взгляд, представлялось, в этой связи, изучение участия в феномене представления антигена макрофагами нейропептидов. Из работ последних лет в области нейроиммунных взаимодействий известна активность нейропептидов в отношении клеток системы мононуклеарных фагоцитов [8—11].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния представителей нового класса гипоталамических пептидов [12, 13] на антигенпредставляющую функцию мышинных перитонеальных макрофагов.

В экспериментах использовали инбредных мышей линии BALB/c (H-2^d), свободных от специфического бактерионосительства. Использовали гипоталамические пептиды (НП), полученные нами, которые применяли в дозах 10^{-16} —1,0 мкг в 0,9%-ном изотоническом растворе хлористого натрия. Использовали ответные перитонеальные макрофаги (ПМФ), полученные на 5-е сутки после внутрибрюшинной инъекции 3 мл 10% тиаглицолята (Abbott Lab., Montreal, Quebec, Canada), методом перитонеального лаважа [14]. Полученные клетки центрифугировали 10 мин при 400 g и ресуспендировали в среде DMEM (Flow Lab. Inc., Virginia, USA). В полученной клеточной суспензии МФ, проверенные на неспецифическую эстеразную активность [15], составляли более 90%. Антигенпредставляющую функцию макрофагов оценивали методом антигенспецифической макрофагзависимой Т-клеточной пролиферации *in vitro* [16]. МФ насаивали в чашках Петри (Costar, Pack. Corp., Cambridge, MA, USA), инкубировали 12 ч при 37° в атмосфере 7% CO₂. Неприкрепленные клетки удаляли 3-кратным интенсивным промыванием монослоя, после чего добавляли одновременно в 5,0 мл среды растворимый глобулярный белковый антиген (гемоцианин крылатого моллюска фиссулярии (KLH) (Ag) Becton-Diskinson, Mountain View, CA, USA) по 30 мкг/мл и НП в различных концентрациях. В контрольные пробы взамен НП вводили 0,9%-ный изотонический раствор хлористого натрия в аналогичных объемах. Спустя 4 ч свободный Ag и НП удаляли 3-кратным интенсивным промыванием монослоя среды. Затем в пробы вносили спленоциты, полученные по методу [17], которые извлекали через 18 ч, обрабатывали митомицином С (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO, USA) в концентрации 35 мкг/мл, 45 мин при 37°, промывали и ресуспендировали в среде по 10^8 клеток/мл. Затем 5×10^6 клеток в 50 мкл среды инъецировали подкожно в подушечки задних лап сингенных мышей. На 7-е сутки извлекали подколенные лимфатические узлы (л/у) гомогенизировали и ресуспендировали в среде RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, N. Y., USA), содержащей 1% свежеприготовленной сыворотки сингенной мыши, 40 мкг/мл гентамицина (Flow Lab. Inc., N. Y., USA) и 5×10^{-5} М 2-меркаптоэтанол (Calbiochem Behring Diagnostics, La Jolla, CA, USA). Затем 5×10^5 клеток в 100 мкл среды культивировали в 96 луночных микроплетках (Costar, Pack. Corp., Cambridge MA, USA) в присутствии 0,05 мкг/мл Ag при 37° в атмосфере 7% CO₂. Через 72 ч после начала культивирования в пробы вносили [³H] тимидин (В/О „Изотоп“) по 1,0 мкКи/мл. Спустя 16 ч клетки харвестировали (Scatron A5, Flow Lab. Inc UK) и подсчитывали включение метки по костимуляции синтеза ДНК в сцинтилляционном счетчике TASC (Packard Instruments, Caversham, UK). Результаты выражали как число имп/мин $\times 10^{-3}$.

Для более полного представления об участии НП в антигенпредставляющей функции макрофагов исследовали также способность НП модулировать продукцию и секрецию ИЛ-2. С этой целью в культуру ИЛ-2-зависимой линии клеток CTLL2 (АКК, С.-Петербург) вносили испытуемые супернатанты, харвестированные через 24, 48 и 72 ч культивирования основных проб, или супернатанты, содержащие стандартный ИЛ-2, полученный культивированием спленоцитов (2×10^6 мл) с конканавалином А („Sigma“ Chem. Co., St. Louis, MO, U S A) (10 мкг/мл), 48 ч при 37° в атмосфере 7% CO_2 . Результаты оценивали в сравнении со стандартным ИЛ-2, величину активности которого принимали за 1000 ед/мл.

С целью исключения секреции под действием НП ИЛ-4, который тоже способен индуцировать пролиферацию CTLL-2 [18], секрецию ИЛ-2 оценивали и в присутствии анти-ИЛ-4 моноклональных антител ИВН (АКК, С.-Петербург). Данные антитела добавляли к CTLL-2 в начале культивирования в концентрации 900 ед/мл, которая полностью блокирует пролиферацию клеток, индуцированную мышинным рекомбинантным ИЛ-4.

Результаты исследования обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе исследования оценивали влияние НП на пролиферативный ответ клеток л/у к Аг, обработанному и представленному ПМФ-ми сингенным спленоцитам. Результаты данного этапа исследования представлены в табл. 1. Как следует из таблицы, НП в широком диапазоне доз от 1,0 до 10^{-14} мкг повышали Аг-специфический пролиферативный ответ клеток л/у в 1,6—5,1 ($p < 0,001$) раза. Фармакокинетически наиболее высокий уровень ответа инициировали НП в дозах 10^{-8} — 10^{-12} мкг.

Таблица 1.
Влияние гипоталамических пептидов (НП)
на АГ-представляющую функцию МФ.

Дозы НП (мкг)	Захват [^3H] тимидина (имп/мин)
К	17,8±0,6
1,0	30,1±1,0
10^{-2}	42,1±1,1
10^{-4}	54,6±1,3
10^{-6}	66,8±1,3
10^{-8}	79,9±1,4
10^{-10}	91,8±1,6
10^{-12}	68,4±1,3
10^{-14}	44,8±1,1
10^{-16}	22,7±0,7

На следующем этапе исследования оценивали влияние НП на продукцию и секрецию ИЛ-2 сенсебилизированными клетками л/у в ответ на Ag. Результаты данного этапа исследования представлены в табл. 2, из которой следует, что НП повышали как продукцию, так и секрецию ИЛ-2. Продукция ИЛ-2 повышалась под влиянием НП уже через 24 ч после начала культивирования культур клеток. Максимальное повышение секреции ИЛ-2 наблюдалось через 48 ч культивирования и было выше таковой в пробах, не содержащих НП, в 2,0—5,8 ($p < 0,001$) раза. Данная активность НП сохранялась в пробах и после их 72-часового культивирования. В этом случае повышение секреции ИЛ-2 имело также статистическую достоверность. Максимально повышенная секреция ИЛ-2 под влиянием НП наблюдалась при применении их в дозах 10^{-8} — 10^{-12} мкг.

Таблица 2.
Влияние гипоталамических пептидов (НП) на
продукцию и секрецию ИЛ-2

Дозы НП (мкг)	Активность ИЛ-2 (ед мл)		
	время инкубации (ч)		
	24	48	72
Контроль	9,8±0,3	28,8±1,6	19,2±0,7
1	17,6±0,8	56,2±3,1	34,2±2,1
10^{-2}	25,0±1,1	84,6±5,4	49,5±2,3
10^{-4}	32,4±1,7	112,9±8,1	65,7±3,8
10^{-6}	42,5±2,1	135,7±8,8	80,9±5,8
10^{-8}	48,2±2,4	167,3±9,8	96,9±6,9
10^{-10}	39,9±2,6	133,7±9,6	79,7±4,8
10^{-12}	30,4±2,1	100,2±8,7	62,4±3,5
10^{-14}	23,1±1,6	66,1±4,7	43,9±2,3
10^{-16}	13,9±0,6	32,4±1,8	26,2±1,3

Заключительный этап исследования включал в себя оценку под влиянием НП секреции ИЛ-2 в присутствии анти-ИЛ-4 моноклональных антител. Результаты данного этапа исследования представлены в табл. 3. Как следует из таблицы, НП повышали продукцию ИЛ-2 в широком диапазоне доз в 1,7—3,7 ($p < 0,001$) раза. Максимальный эффект НП проявлялся в дозах 10^{-6} — 10^{-12} мкг. Аналогичный эффект повышения продукции ИЛ-2 НП наблюдали и в присутствии анти-ИЛ-4 моноклональных антител. Данный факт свидетельствует, что обнаруженный эффект НП повышать продукцию ИЛ-2 не связан с присутствием в супернатантах обнаруживаемого количества ИЛ-4.

Основной задачей настоящего исследования явилось установление факта участия гипоталамических пептидов в антигенпредставляющей функции макрофагов. Было установлено, что НП обладают способностью повышать данную иммунологическую функцию МФ. Это

продемонстрировано в методе Ag-специфической МФ-зависимой Т-клеточной пролиферации *in vitro*. Монослой ПМФ культивировались с растворимым глобулярным белковым Ag в присутствии или в отсутствие НП, промывались и культивировались с клетками селезенки. Затем, собранные и обработанные митомином С спленоциты инъецировали сингенным мышам. Клетки л/у, дренирующие область введения Ag, тестировались на специфический ответ к Ag, пролиферацией и секретцией фактора роста Т-клеток—ИЛ-2. Данная тест-система позволяет судить о начальном этапе первичного ответа к Ag популяцией непримированных клеток и характеризует раннюю фазу представления Ag. С помощью этой тест-системы ранее были установлены повышающие Ag-представляющую функцию МФ свойства у таких иммуномодуляторов, как тафтсин и синтетические тимические пептиды из тимозина фракции 5—тимозинов α_1 и β_1 [6, 7]. Известно, что эти два пептида являются единственными, выделенными в чистом виде и синтезированными из семейства 40—60 пептидов, входящих в состав тимозина фракции 5 [19]. Известно также, что они принимают участие в регуляции секреторных функций гипоталамуса, гипофиза, надпочечников и осуществляют взаимодействие между ними [20]. Обнаружение нами активности НП, аналогичной тимозинам, представляется интересной и перспективной в плане приближения объяснений механизмов нейрониммунных взаимодействий. Актуально значимой представляется изучение их роли в ободозависимой регуляции.

Таблица 3

Влияние гипоталамических пептидов (НП) на секретрию ИЛ-2 в присутствии анти-ИЛ-4 Мон АТ.

Дозы НП (мкг)	Активность ИЛ-2 (ед мл)	
	без Мон АТ	с Мон АТ
контр. (без Ag)	2,8±0,83	21,3±0,6
контр. (с Ag)	4,0±0,06	19,2±0,9
1	31,0±0,6	32,8±1,1
10 ⁻²	41,2±0,8	40,1±2,2
10 ⁻⁴	49,1±1,1	48,2±2,6
10 ⁻⁶	56,4±3,1	55,7±3,1
10 ⁻⁸	63,8±3,6	63,2±4,4
10 ⁻¹⁰	71,6±4,1	70,8±4,8
10 ⁻¹²	52,9±3,2	52,0±2,5
10 ⁻¹⁴	35,0±2,6	32,7±1,8
10 ⁻¹⁶	16,1±0,8	14,0±0,9

Показанное нами повышение Ag-представляющей функции МФ НП-ми являлось иммунологически специфическим и сопровождалось повышенной продукцией ИЛ-2. Известно, что индуцировать пролиферацию мышинных ИЛ-2 зависимых клеточных линий, включая и

использованную нами CTLL, способен также и ИЛ-4 (фактор роста В-клеток). В этой связи возникла необходимость выяснить сопровождается ли модуляция НП-ми секреции ИЛ-2 повышенной секрецией ИЛ4, приводящего к повышению пролиферации CTLL. Нам было установлено, что добавление нейтрализующих концентраций анти-ИЛ-4 мышинных моноклональных антител (ИВИ) к супернатантам, содержащим ИЛ-2, не отменяло пролиферацию CTLL. Так было подтверждено участие в исследуемом феномене именно фактора роста Т-клеток.

Так как НП удалялись из культур интенсивным промыванием до внесения в культуры спленоцитов, можно предположить, что Аг-представляющая функция МФ повышается ими непосредственно. Однако возможно, что остаточное количество НП все же присутствовало в течение периода сенсибилизации *in vitro*. В любом случае остается фактом, что НП повышали раннюю фазу представления Аг. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этого феномена изучаются. Можно предположить, что механизмы, посредством которых НП модулируют МФ-Т-клеточные взаимодействия, могут быть вовлечены в повышение эффективности захвата, обработки и представления Аг МФми и/или содействие взаимодействию или переносу информации Т-клеткам. Эти эффекты могут отражаться на повышении продукции ИЛ-2 и других цитокинов, а также экспрессии их рецепторов на лимфоцитах, приводящих к повышению их пролиферации. Примечательным является тот факт, что наивысшая активность НП проявлялась в дозах 10^{-8} — 10^{-12} мкг, что соответствует области физиологической активности большинства пептидных гормонов.

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что гипоталамические пептиды потенцируют Аг-представляющую функцию МФ. Они повышают Аг-специфическую МФ-зависимую Т-клеточную пролиферацию, а также продукцию и секрецию фактора роста Т-клеток—ИЛ-2.

HYPOTHALAMIC PEPTIDES ENHANCE THE ANTIGEN-PRESENTING FUNCTION OF MACROPHAGES.

APRIKIAN V. S., GALOYAN K. A.

H. Kh. Buniatian Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci. of Rep. Armenia, Yerevan

The influence of a new class of hypothalamic peptides (HP) on the antigen-presenting function of mouse peritoneal macrophages (MO) was investigated. It was determined that HP potentiated the given immunological phenomenon. HP in physiological concentrations enhanced antigen-specific MO-dependent T-cell proliferation *in vitro* and IL-2 production and secretion in CTLL-2 cell culture.

1. *Unanue E. R.* Ann. Rev. Immunol., v. 2, p. 395—428, 1984.
2. *Austyn J. M.* Antigen-presenting cells. IRI. Press, Oxford Univ., N. Y., 1982.
3. *Grey H. M., Chesnut R.* Immunol. Today., v. 6, p. 101, 1985.
4. *Austyn J. M., Wood K. J.* Principles of cellular and molecular immunity. Oxford Univ., Press, Oxford, N. Y., p. 608, 1992.
5. *Trehoval E., Segal S., Stabinsky Y., Fridkin M., Spirer Z., Feldman M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA. v. 75, p. 3100—3404, 1978.
6. *Dagan S., Trehoval E., Fridkin M., Feldman M. J.* Biol. Response Mod., v. 6, p. 625—636, 1987.
7. *Trehoval E., Srteln M., Goldstein A. L.* Immunopharmacol., v. 18, p. 107—113, 1989.
8. *Niethammer D.* Neuroendocr. Lett., v. 9, p. 274—280, 1987.
9. *Koff W. C., Duncan M. A. J.* Immunol., v. 135, p. 350—354, 1985.
10. *O'Dorisio M. S., O'Dorisio T. M., Calland S., Balcerzak S. J.* Lab. Clin. Med., v. 96, p. 662—672, 1980.
11. *Kavejaars A., Ballieux R. E., Heijnen C. J.* J. Immunol., v. 142, p. 1338—1342, 1989.
12. *Galoyan A. A.* Ergebnisse der Experimentellen Medizin., v. 29, p. 99—115, 1978.
13. *Galoyan A. A.* Neurochem. Res., v. 11, p. 769—787, 1986.
14. *Unanue E. R., Kiely J. M., Calderon J. J.* Exp. Med., v. 144, p. 155, 1976.
15. *Sonne O., Pedersen K., Kudahl K., Fisker S.* Scand. J. Immunol., v. 33, p. 231—235, 1991.
16. *Steinman L., Trehoval E., Cohen I. R., Segal S., Glickman E.* Eur. J. Immunol., v. 8, p. 29—34, 1978.
17. *Julius M. H., Simpson E., Herrenberg L. W.* Eur. J. Immunol., v. 3, p. 645, 1973, 1986.
18. *Smith C. A., Rennick D. M.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA., v. 83, p. 1857—1861, 1986.
19. *Goldstein A. L., Low T. L. K., Zatz M. M., Hall N. R., McGlure J. E., Hu S., Sohulof R. S.*—In: Mihlick E. (ed.) Immunological approaches to cancer therapeutics, N. Y., John Wiley 137, 1982.
20. *Koutabb N.* (ed.) Tlymich hormones: Immunologic mechanism and therapeutic action, N. Y., Marcel Dekker, 1985.

Поступила 18. III, 1992.

УДК 577.171.59.175.317

ГИПОТАЛАМИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ ПОВЫШАЮТ ПРОДУКЦИЮ ИНТЕРЛЕЙКИНА-1 МЫШИНЫМИ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫМИ МАКРОФАГАМИ

АПРИКЯН В. С., ГАЛОЯН К. А., ГАЛОЯН А. А.

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

Исследовали влияние гипоталамических пептидов на продукцию ИЛ-1 ЛПС стимулированными мышными перитонеальными макрофагами.

Обнаружили, что гипоталамические пептиды интенсифицируют выработку ИЛ-1, повышая раннюю стадию активации макрофагов ЛПС *in vitro*, в физиологических концентрациях.

Проблема нейропептидной регуляции иммунного ответа приобретает все большую актуальность благодаря значительному прогрессу в области нейрониммунотуляции, достигнутому в последние годы [1—5]. Известно, что передача сигналов между разными типами иммунокомпетентных клеток в процессе их взаимодействия при развитии иммунных реакций осуществляется медиаторами иммунной системы. Эти молекулярные субстанции эндогенного происхождения — лимфокины и монокины, секретируются специфическими клетками лимфоидного и моноцитарного ряда. Они обеспечивают созревание, дифференцировку, пролиферацию и функциональную активность иммуноцитов, регулируют развитие отдельных этапов иммуногенеза, опосредуют кооперативные процессы межклеточных взаимодействий, необходимых для реализации их эффекторных функций [6—7]. Большинство эндогенных биорегуляторных факторов не имеют родства к антигенам. Следовательно, они не специфичны и не обладают избирательным действием в отношении лимфоидных клеток и имеют белковую или полипептидную природу. Их функциональная активность в основном связана с определенными пептидными фрагментами, входящими в состав цельной молекулы. Эндогенные пептидные регуляторные факторы претендуют на роль универсальных регуляторов, участвующих в развитии многих биологических процессов. Они обладают способностью взаимодействовать с различными клетками-мишенями. В связи с чем оказывают влияние на различные аспекты жизнедеятельности организма, участвуя в реализации межсистемных взаимодействий. В этой связи интересным представлялось изучение взаимодействия гипоталамических пептидов и иммунокомпетентных

клеток, в частности макрофагов. Одной из основных иммунологических функций данного класса иммуноцитов является их способность вырабатывать интерлейкин-1 (лимфоцитактивирующий фактор), являющийся в настоящее время одним из наиболее изученных медиаторов иммунной системы.

Целью настоящего исследования было изучение влияния нового класса гипоталамических пептидов, обнаруженных и охарактеризованных Галояном [8—9], на изменение выработки интерлейкина-1 мышинными перитонеальными макрофагами.

Материалы и методы

Использовали свободных от специфического бактерионосительства инбредных мышей линий BALB/c (H-2^d) и C3H/HeI, 8-недельного возраста. Гипоталамические пептиды (НП), полученные нами, применяли в дозах 10^{-16} —1,0 мкг в 0,9%-ном изотоническом растворе хлористого натрия. Ответные перитонеальные макрофаги (МФ) получали на 5-е сутки после внутрибрюшинной инъекции 3 мл 10% тногликолята (Abbott Lab., Montreal, Quebec, Canada) стандартной перитонеальной лаважа [10]. В полученной клеточной суспензии МФ, тестируемые на неспецифическую эстеразную активность [11], составляли более 90%. Культуры МФ стимулировали к продукции интерлейкина-1 (ИЛ-1) по методу [12] в модификациях. Так, монослой МФ инкубировали в бессывороточной среде RPMI-1640 (Gibco, Grand Isl., N. Y., USA) при 37° в атмосфере 7% CO₂. Продукцию ИЛ-1 индуцировали добавлением в культуры МФ липополисахарида (ЛПС) из *S. Typhosa* 0901 (Difco Lab., Detroit, Mich., USA) 10 мкг/мл. НП вносили в культуры МФ одновременно с ЛПС. Через различные сроки инкубации—2—4—6—12—24—48 ч супернатанты (с/н) культур МФ собирали и хранили при -20°. Жизнеспособность МФ определяли с помощью трипанового синего. Адгезивные свойства МФ оценивали по количеству адгерентных клеток. В каждой пробе подсчитывали 500 клеток. Активность ИЛ-1 в с/н определяли по влиянию на изменение пролиферации тимоцитов мышей C3H/HeI в присутствии субмитогенных доз фитогемагглютинина (ФГА) („Sigma“ Chem. Co., St. Louis, MO, USA)—1 мкг/мл. Постановку теста осуществляли в 96-луночных микроплетках (Costar, Pack. Corp., Cambridge, MA, USA). Клетки суспензировали в питательной среде, содержащей RPMI-1640 (Gibco). 10% термoinактивированной фетальной телячьей сыворотки (Gibco Grand Island, N. Y. USA), 2 мМ L-глутамина (Flow Lab. Inc. Virg., USA) 5×10^5 М 2-меркаптоэтанола (Calbiochem Behring), Diagnostics, La Jolla, CA, USA) 2×10^5 в объеме 0,2 мл. Активность с/н тестировали в различных разведениях 1:2, 1:4, 1:8 и т. д.). Продолжительность культивирования составляла 72 ч при 37° в атмосфере 7% CO₂. В последние 24 ч в культуры вносили [³H] тимидин по 0,5 мКи/луночку (В.О. Изо-

топ"). Затем клетки харвестировали (Scatron A5, Flow Lab. Inc., UK) и измеряли количество включившегося [^3H] тимидина по костимуляции синтеза ДНК в культуре тимоцитов на сцинтилляционном счетчике β -радиоактивности (TASC, Packard Instruments, Caversham, UP). Результаты выражали в имп/мин, а также в ед/активности. За единицу активности ИЛ-1 в каждом с/н принимали такое его разведение, которое давало 50% от максимального включения [^3H] тимидина в тимоциты. Активность с/н сравнивали со стандартным, с удельной активностью 100 ед/мл. Все с/н проверяли на активность, подобную интерлейкину-2 (ИЛ-2) по их способности поддерживать пролиферацию ИЛ-2 зависимой линии цитотоксических Т-клеток CTLL-2 (АКК, С.-Петербург). С этой целью клетки CTLL ($2 \times 10^4/100$ мкл) в присутствии 5%-ной фетальной телячьей сыворотки и $2,5 \times 10^{-5}$ 2-МЭ инкубировали со 100 мкл с/н, либо с аналогичным количеством стандартного ИЛ-2 при 37° в атмосфере 7% CO_2 24 ч. В последние 6 ч инкубации в культуры вносили [^3H] тимидин по 0,5 мКи. Результаты оценивали в сравнении со стандартным ИЛ-2, полученным культивированием спленоцитов ($2 \times 10^6/\text{мл}$) с 10 мкг/мл конкавалина А („Sigma“ Chem. Co., St. Louis, MO, USA), величину активности которого принимали за 1000 ед/мл.

Результаты и обсуждение

На начальном этапе исследования изучали наличие активности, подобной ИЛ-1 в с/н культур МФ, стимулированных ЛПС, в сравнении со стандартным ИЛ-1. Так, было установлено, что активность стандартного ИЛ-1 в разведении 1:2 составила 20153 ± 526 имп/мин. Активность испытуемых с/н культур МФ составила 16121 ± 364 имп/мин. Затем изучали наличие активности, подобной ИЛ-2 в с/н культур МФ. Было установлено, что активность стандартного ИЛ-2 составляет 23265 ± 658 имп/мин, активность с/н МФ культур была недостоверной и составила 270 ± 22 имп/мин, активность питательной среды 142 ± 12 имп/мин. Таким образом, было установлено наличие в с/н исследуемых культур МФ активности, подобной ИЛ-1, и отсутствие активности, подобной ИЛ-2.

Следующий этап исследования был посвящен изучению действия НП на продукцию ИЛ-1. Результаты данного этапа исследования представлены в табл. 1. Как следует из таблицы, НП в широком диапазоне доз потенцировали ЛПС-стимулированную продукцию ИЛ-1 МФ-ми в 1,3 ($p < 0,05$)—3,3 ($p < 0,001$) раза. Наилучший эффект под влиянием НП проявлялся в дозах 10^{-8} — 10^{-12} мкг. Потенцирование НП выработки ИЛ-1 не сопровождалось повышением количества жизнеспособных МФ и их адгезии. Данные показатели находились в пределах, установленных для контрольных культур МФ, не обработанных НП. В табл. 2 представлены результаты исследования кинетики продукции ИЛ-1 ЛПС стимулированными МФ в отсутствие НП. Как следует из таблицы, ИЛ-1 появлялся в с/н МФ культур уже

спустя 2 ч после начала инкубирования МФ с ЛПС. Концентрация ИЛ-1 достигала максимума к 24 ч. Данное положение согласуется с результатами исследований других авторов [13—14]. Интенсивность выработки ИЛ-1 между 24 и 48 ч инкубации была статистически недостоверной. Результаты кинетического исследования потенцирующего выработку ИЛ-1 ЛПС стимулированными МФ действия НП, добавленных в различные сроки инкубации после ЛПС, также представлены в табл. 2. НП применяли в дозе 10^{-10} мкг. Культуральные с/н исследовали на ИЛ-1 подобную активность после 48 ч инкубации. Как следует из таблицы, НП потенцировали выработку ИЛ-1 в начальном периоде инкубации. Наивысшая активность НП проявлялась в убывающем порядке: при одновременном с ЛПС введении в культуры МФ—0 ч, затем 2 и 4 ч. Таким образом, НП проявляют активность не только при введении в культуры МФ одновременно с ЛПС. Данный факт свидетельствует, что потенцирующий эффект НП связан с их действием именно на МФ, а не с пролиферацией тимоцитов. Результаты кинетического анализа указывают также на тот факт, что действие НП проявляется еще до секретиции ИЛ-1 в культуральный с/н, то есть в период ранней фазы синтеза мРНК. Можно предположить, что их действие наиболее эффективно в период синтеза ИЛ-1, хотя может распространяться и на начальный период секретиции.

Таблица 1

Действие НП на продукцию ИЛ-1 ЛПС стимулированными МФ через 48 ч инкубации

Дозы НП (мкг)	Активность ИЛ-1 (ед/мл)	
	НП без ЛПС	НП с ЛПС
контроль ЛПС без НП	5,0±0,1	75,0±3,2
1	5,4±0,1	105,2±7,6
10^{-2}	6,1±0,2	137,0±8,7
10^{-4}	5,7±0,2	162,7±9,8
10^{-6}	7,0±0,3	193,7±9,9
10^{-8}	8,1±0,3	222,2±9,7
10^{-10}	8,6±0,4	250,0±9,1
10^{-12}	7,3±0,3	176,0±9,0
10^{-14}	5,4±0,1	111,1±9,3
10^{-16}	4,6±0,1	74,9±6,3

Таблица 2

Кинетика продукции ИЛ-1 ЛПС стимулированными МФ в отсутствие НП и в присутствии НП, добавленных в различное время после ЛПС.

Время инкубации (ч)	Активность ИЛ-1 (ед/мл)	
	без НП	НП (10^{-10} мкг)
К	—	82,1±6,6
0	—	228,8±9,8
2	10,5±0,8	145,5±9,8
4	21,3±1,5	118,8±7,7
6	48,9±2,1	93,9±8,1
12	76,9±5,4	87,7±6,7
24	104,4±8,6	82,6±6,1
48	89,6±6,6	—

Результаты настоящего исследования показали, что НП потенцируют раннюю стадию активации МФ ЛПС-ом *in vitro*, приводящую к повышению продукции ИЛ-1. НП проявляют данный эффект в физиологических концентрациях 10^{-8} — 10^{-12} мкг. Значение данного эффекта НП остается невыясненным. В настоящее время известны лишь некоторые механизмы обратной ИЛ-1 обусловленной связи. Так, известна способность α -меланоцитстимулирующего гормона ингибиро-

вать биологический ответ, индуцируемый ИЛ-1 [3]. Известно также, что ИЛ-1 стимулирует секрецию гипоталамического кортикотропин-рилизинг фактора [4]. Вероятно, присутствие НП необходимо в ранней фазе активации МФ. В пользу данного предположения свидетельствует обнаруженный факт наибольшей эффективности НП в период биосинтеза ИЛ-1. Основываясь на результатах проведенного исследования, можно предположить, что НП могут потенцировать следующие ИЛ-1-зависимые процессы: Т-клеточная активация—индукция Т-клеточной пролиферации, активация Т-клеток в период представления антигена, индукция выработки лимфокинов и экспрессия рецепторов Т-хелперами; В-клеточная активация—повышение пролиферации и дифференцировки В-клеток; хемотаксис полиморфно-ядерных нейтрофилов; воспаление; мышечный протеолиз; острая фаза синтеза протеинов; пролиферация фибробластов; продукция протеолитических ферментов, коллагеназы и ПГЕ₂ синовиальными клетками, активатора плазминогена и др.

HYPOTHALAMIC PEPTIDES ENHANCE THE INTERLEUKIN-1 PRODUCTION BY MOUSE PERITONEAL MACROPHAGES

APRIKIAN V. S., GALOYAN K. A., GALOYAN A. A.

H. Kh. Buniatian Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci. of Rep. Armenia, Yerevan

The influence of a new class of hypothalamic peptides (HP) on the IL-1 production by LPS stimulated mouse peritoneal macrophages (MO) was investigated. It was found that HP in physiological concentrations potentiated the IL-1 production as well as the early stage of MO activation by LPS *in vitro*.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Nathamer D. Neuroendoctr. Lett., v. 9, p. 274—280, 1987.
2. Blalock J. E., Harhour D., McMennan, Smith E. J. Immunol., v. 135, p. 858—861, 1985.
3. Robertson B., Dostal K., Daynes R. A. J. Immunol., v. 140, p. 4300—4307, 1988.
4. Sapolsky R., Rivier C., Yamamoto G., Paoletsky P., Vale W. Science, v. 238, p. 522—524, 1987.
5. Berkenbosch F., Van Oers J., Del Rey A., Tilders F., Besedovsky H. Science, v. 238, p. 524—525, 1987.
6. Fenichel R. L., Chirgus A. (eds) Immune modulators agents and their mechanisms. Marcel Dekker, N. Y., 1984.
7. Nelson D. S. Natural immunity. Sydney etc., 1989.
8. Galoyan A. A. Ergebnisse der Experimentellen Medizin, v. 29, p. 99—115, 1978.
9. Galoyan A. A. Neurochem. Res., v. 11, p. 769—787, 1986.
10. Unanue E. H., Kiely J. M., Calderon J. J. Exp. Med., v. 144, p. 155, 1976.
11. Sonne O., Pederson K., Kudahl K., Fisker S. Scand. J. Immunol., v. 33, p. 231—235, 1991.
12. Bradley L. M. In: Selected Methods in Cellular Immunology (eds. B. B. Mishell, S. M. Shigji). San Francisco, p. 156—160, 1980.
13. Windle J. J., Shir H. S., Morrow J. F. J. Immunol., v. 132, p. 1317—1322, 1984.
14. Brandwein S. R. J. Biol. Chem., v. 261, p. 8624—8632, 1986.

Получила 18. III. 1992

УДК 577.156:612.8.015

**ВЛИЯНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА
НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н
(КФ.3.4.17.10) ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС****ГЕНГИН М. Т., ВЕРНИГОРА А. Н.**

Пензенский государственный педагогический институт им. В. Г. Беллинского

Установлено, что при однократном эмоционально-болевым стрессе в отделах мозга крыс имеет место повышение активности карбоксипептидазы Н, особенно в гипофизе и гипоталамусе, что при хроническом эмоционально-болевым стрессе сменяется тенденцией к нормализации активности фермента. Предполагается участие последнего в формировании механизма стрессорных реакций и возможная роль его растворимой и мембраносвязанной форм в процессинге секторных пептидов и нейропептидов, обладающих центральным действием соответственно.

В развитии стрессорных реакций и адаптации к ним вовлекаются стресс-пептиды гипоталамуса, гипофиза [1, 2] и другие, в том числе и опиоидные пептиды [3]. Механизмы ферментативного обеспечения обмена нейропептидов при стрессе практически не изучены. Нейропептиды синтезируются в виде предшественников, из которых при избирательном протеолизе образуются активные пептиды [4]. На конечных этапах процессинга пропептидов участвует карбоксипептидаза Н—фермент, отщепляющий основные аминокислоты с С-конца пропептидов, в связи с чем он, как полагают [5], может контролировать образование биологически активных пептидов и таким образом вовлекаться в развитие стрессорных реакций. Подтверждением этому служат данные об относительно высокой активности этого фермента в гипофизе [5]—отделе, ответственном за синтез стресс-пептидов.

В представленной работе исследовали влияние однократного и хронического эмоционально-болевого стресса на активность карбоксипептидазы Н в различных отделах головного мозга крыс.

Материалы и методы

Опыты проводили на самцах белых беспородных крыс массой 250—300 г, подразделенных на 3 группы: I—интактные (контроль), II и III—подвергнутые соответственно однократному и хроническому эмоционально-болевому стрессу. Животных II группы в течение 2-х ч через каждые 10 с в беспорядочном режиме подвергали воздействию

одного из трех факторов длительностью I с (вспышка света, звонок, электрокожное раздражение пороговой силы), а III группы в течение 30 дней ежедневно подвергали однократному эмоционально-болевого стрессу. Животных II и III групп деканитировали через 18 ч после окончания воздействия, извлекали головной мозг и разделяли его на отделы.

Мембранную и растворимую фракции получали центрифугированием гомогената, приготовленного на 50 мМ натрий-ацетатном буфере, рН 5,6, в течение 60 мин 20000 g при 4°. Активность карбоксипептидазы Н определяли по методу Flicker, Snyder [6] с использованием в качестве субстрата дансил-фен-лей-арг. Белок определяли по Lowry и соавт. [7].

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента [8] и считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Как явствует из таблицы, при однократном эмоционально-болевого стрессе отмечалось достоверное повышение активности карбоксипептидазы Н всех фракций гипофиза, гипоталамуса и серого вещества мозга. В среднем мозгу этот сдвиг наблюдался в гомогенате и мембранной фракции, в стриатуме—в гомогенате, в гиппокамне—в мембранной фракции. В растворимой фракции среднего мозга, мембранной и растворимой фракциях стриатума и гомогенате гиппокамня достоверных изменений активности карбоксипептидазы Н не обнаруживалось. В растворимой фракции гиппокамня имело место некоторое понижение активности фермента.

Таким образом, в целом, однократное развитие эмоционально-болевого стресса сопровождается повышением активности изученного фермента, что хорошо коррелирует с данными об увеличении содержания и секреции ряда нейропептидов при стрессе [1, 2, 9—11]. По степени повышения активности фермента отделы располагались в следующем порядке: гипофиз (на 59%), гипоталамус (на 46%), серое вещество (на 38%), средний мозг (на 28%), стриатум (на 20%). Наиболее существенное повышение активности карбоксипептидазы Н наблюдалось в гипофизе и гипоталамусе—отделах, отвечающих за синтез и секрецию стресс-пептидов [1], что, вероятно, свидетельствует о вовлечении фермента в процессинг этих пептидов.

При хроническом эмоционально-болевого стрессе активность карбоксипептидазы Н в гипофизе во всех фракциях отделов мозга была достоверно выше, чем в норме, а в гомогенате и растворимой фракции—ниже, чем при однократном эмоционально-болевого стрессе (см. таблицу). В гипоталамусе активность фермента повсюду была выше, чем в норме, в гомогенате достоверно ниже по сравнению с однократным эмоционально-болевым стрессом, в гомогенате же стриатума активность карбоксипептидазы Н не отличалась от нормы. В сером веществе и гиппокамне активность фермента также не отличалась от нормы.

Таблица

Влияние однократного и хронического эмоционально-болевого стресса на активность карбоксипептидазы II в отделах мозга крыс (нМ дансил-фен-лей, образованности за 1 мин инкубации на 1 мг ткани (1) и на 1 мг белка (2));

Группа животных	Гипофиз		Гипоталамус		Средний мозг		Стриатум		Гиппокамп		Серое вещество		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Норма (1)	Г	1,7± 0,1	15,6± 1,1	0,074± 0,007	0,91± 0,09	0,071± 0,003	0,72± 0,03	0,056± 0,004	0,61± 0,04	0,104± 0,003	1,17± 0,03	0,040± 0,003	0,46± 0,03
	Р	0,30± 0,03	9,3± 0,9	0,0087± 0,0006	1,18± 0,08	0,0118± 0,0006	1,30± 0,07	0,0110± 0,0008	1,55± 0,11	0,0167± 0,0013	2,11± 0,17	0,0100± 0,0003	1,06± 0,03
	М	0,45± 0,04	8,9± 0,9	0,065± 0,007	0,77± 0,10	0,051± 0,003	0,65± 0,04	0,050± 0,004	0,64± 0,05	0,037± 0,006	0,89± 0,08	0,034± 0,003	0,47± 0,04
Однократный стресс (2)	Г	2,7± 0,1	21,5± 0,9	0,108± 0,004	1,33± 0,05	0,091± 0,003	0,52± 0,03	0,067± 0,003	0,74± 0,09	0,104± 0,006	1,17± 0,07	0,055± 0,003	0,63± 0,03
	Р	0,53± 0,03	16,6± 0,9	0,0118± 0,0004	1,59± 0,08	0,0113± 0,0005	1,24± 0,07	0,0104± 0,0010	1,46± 0,14	0,0140± 0,0013	1,77± 0,16	0,0132± 0,0005	1,40± 0,05
	М	0,60± 0,11	11,5± 2,1	0,089± 0,006	1,25± 0,08	0,075± 0,010	0,96± 0,13	0,049± 0,001	0,63± 0,01	0,092± 0,001	1,21± 0,01	0,045± 0,003	0,62± 0,04
Хронический стресс (8)	Г	2,3± 0,1	20,9± 5,9	0,094± 0,005	1,04± 0,06	0,063± 0,007	0,64± 0,07	0,056± 0,005	0,62± 0,04	0,098± 0,007	1,10± 0,08	0,040± 0,003	0,46± 0,03
	Р	0,44± 0,03	13,8± 0,9	0,0174± 0,0008	2,35± 0,11	0,0110± 0,0003	1,21± 0,10	0,0116± 0,0009	1,63± 0,13	0,0169± 0,0016	2,14± 0,20	0,0100± 0,0014	1,06± 0,15
	М	0,66± 0,05	12,7± 1,2	0,074± 0,004	1,04± 0,06	0,066± 0,005	0,85± 0,06	0,050± 0,002	0,64± 0,03	0,071± 0,007	0,93± 0,09	0,034± 0,001	0,47± 0,02

Примечание: Г—гомогенат, Р—растворимая, М—мембранная фракция; М±m; n=5÷6; *—p<0,05, **—p<0,01, ***—p<0,001; *—p по отношению к норме, x—p по отношению к однократному эмоционально-болевному стрессу).

Таким образом, в отделах мозга крыс при хроническом эмоционально-болевым стрессе наблюдалась тенденция к нормализации активности карбоксипептидазы Н, причем в стриатуме, гиппокампе и сером веществе она не демонстрировала существенных отклонений от норм. Тенденция к нормализации активности карбоксипептидазы Н при хроническом эмоционально-болевым стрессе хорошо согласуется с представлениями о тенденции к нормализации уровня нейропептидов при адаптации к стрессу [1, 2, 9, 11].

Обращает на себя внимание тот факт, что если в гипоталамусе и сером веществе при однократном эмоционально-болевым стрессе активность растворимой и мембраносвязанной форм повышалась равномерно (на 36 и 37, 32 и 32% соответственно), то в гипофизе активность растворимой формы фермента повышалась примерно в 2,5 раза сильнее, чем мембраносвязанной (на 77 и 31% соответственно, таблица). В среднем мозгу активность карбоксипептидазы Н повышалась в мембранной фракции и не изменялась в растворимой, в гиппокампе при повышении активности фермента в мембранной фракции наблюдалось снижение активности в растворимой.

Итак, в различных отделах головного мозга однократный эмоционально-болевым стресс по-разному влияет на активность мембраносвязанной и растворимой форм фермента, что, по всей видимости, является свидетельством о существующих различиях этих форм фермента.

В настоящее время высказывается предположение о том, что растворимая и мембраносвязанная формы карбоксипептидазы Н участвуют в процессинге различных пептидов [12]. В гипофизе, синтезирующем секреторные пептиды и значительно интенсивнее при стрессе [1, 2], активность растворимой формы повышается несравненно больше, чем мембраносвязанной, что позволяет допустить вероятность вовлечения растворимой формы фермента в биосинтез этих пептидов. В среднем мозгу и гиппокампе, не синтезирующих секретлируемых пептидов, при стрессе отмечается повышение содержания энкефалинов, эндорфинов, вещества Р, пептида дельта-сна [9, 11], а также активности мембраносвязанной формы. Вместе с тем активность растворимой формы фермента либо не претерпевает заметных изменений, либо понижает, что указывает на возможное вовлечение мембраносвязанной формы карбоксипептидазы Н в процессинг предшественников этих пептидов. Отмечающиеся в гипоталамусе при стрессе значительное интенсифицирование синтеза кортикотропин-рилизинг фактора, секретлируемого в кровь и регулирующего секрецию адренокортикотропина гипофизом [1], сопровождается повышением содержания энкефалинов, вещества Р и других пептидов [9—11] с одновременным возрастанием активности растворимой и мембраносвязанной форм фермента примерно в одинаковых пределах.

Предположение о возможном вовлечении растворимой формы карбоксипептидазы Н в процессинг секреции пептидов, а мембраносвязанной — пептидов, обладающих центральным действием, подтверждается и тем фактом, что в тканях, продуцирующих секреторные

пептиды (β -клетки поджелудочной железы, хромоаффинные клетки надпочечников, гипофиз), растворимая форма составляет 90, 70 и 50% от общей активности, тогда как в отделах головного мозга содержание растворимой формы колеблется от 18—20 до 30—35% [13, 14].

Таким образом, весьма вероятно вовлечение карбоксипептидазы H в развитие стрессорных реакций, а хорошая корреляция изменений активности фермента со сдвигами уровня нейропептидов является подтверждением возможного участия карбоксипептидазы H *in vivo* в реакции превращений предшественников биологически активных пептидов. При этом не исключено вовлечение растворимой формы фермента в процессинг секретируемых пептидов, обладающих центральным действием.

Исходя из вышесказанного, представляло интерес изучение особенностей растворимой и мембраносвязанной форм карбоксипептидазы H при различных физиологических и патологических состояниях организма, что может быть полезным как для современного понимания биологической роли фермента и механизмов его регуляции *in vivo*, так и для выяснения путей формирования новых статусов функционирования энзимов, характерных для стартирования, развития и генерализации болезненного процесса.

INFLUENCE OF EMOTIONAL-ALGESIC STRESS ON THE ACTIVITY OF CARBOXYPEPTIDASE H (EC 3.4.17.10) OF RAT BRAIN

GENGIN M. T., VERNIGORA A. N.

State Pedagogical Institute, Penza

It is established that carboxypeptidase H activity during single-dose emotional-algesic stress increases in region of rat brain, the largest increasing of enzyme activity is observed in pituitary and hypothalamus. Tendency to normalization of enzyme activity during chronic emotional-algesic stress is observed. It is supposed that carboxypeptidase H is involved in the development of stress reaction, as well as that soluble forms of the enzyme can take part in the processing of secretory peptides, and the membrane-bound ones can take part in the processing of neuropeptides which have central action.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Makara G. B., Palkovits M., Szentagothai J. Selye's guide to stress research (ed. Selye H.). New York, Van Nostrand Reinhold Co., p. 280—337, 1980.
2. Лишманов Ю. Б., Трифонова Ж. В., Цибин А. И. и др. Бюл. эксперим. биол. т. 53, № 4, с. 422—424, 1987.
3. Слепушкин В. Д., Лишманов Ю. Б., Золов Г. К., Прун Н. А. Успехи физиол. наук, т. 16, № 4, с. 106—118, 1985.
4. Lynch D. R., Snyder S. H. Ann. Rev. Biochem., v. 55, Calif., Pale Alto, p. 773—799, 1986.
5. Fricker L. D. Trends Neurosci., v. 8, № 5, p. 210—214, 1985.

6. *Fricker L. D., Snyder S. H.* Procl. Natl. Acad. Sci. USA, v. 79, p. 3886—3890, 1982.
7. *Lowry O. H., Rosebrought N. J., Farr A. G., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
8. *Ойвин И. А.* Пат. физиология и эксперим. медицина т. 4, № 4, с. 76—85, 1969.
9. *Тигранян Р. А.* Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 63—71, 1987.
10. *Салиева Р. М., Коплик Е. В., Каменов З. А., Полетаев А. Б.* Бюл. эксперим. биол., т. 56, № 9, с. 264—266, 1988.
11. *Oehme P.* Wiss. Beitr. M.—Luther Univ./Wittenberg P.—Halle, v. 32, p. 179—190, 1988.
12. *Гомазков О. А., Григорьянц О. О.* Успехи соврем. биол., т. 108, № 1 (4), с. 109—124, 1989.
13. *Davidson H. W., Hutton J. C.* Blochem. J., v. 245, p. 575—582, 1987.
14. *Supattapone S., Fricker L. D., Snyder S. H.* J. Neurochem., v. 42, p. 1017—1023, 1984.

Поступила 18. XII 1991

УДК 577.123.5

АКТИВНОСТЬ РИБОНУКЛЕАЗЫ И ДНК-ЗАВИСИМОЙ
РНК ПОЛИМЕРАЗЫ В МОЗГУ ПРИ ДЕЙСТВИИ
ПИРАЗОЛОВЫХ СОЕДИНЕНИЙХАЧАТРЯН Г. С., АНТОНЯН А. А., КАЗАРЯН А. Р., ХАЧАТРЯН В. Г.,
ГАЛСТЯН Г. Г., ВАГРАДЯН А. Г.

Филиал ВНИИГИНТОКСа, Ереван

Изучена активность рибонуклеазы, ДНК-зависимой РНК-полимеразы в клетках головного мозга крыс при острой интоксикации пиразоловыми соединениями. Показано значительное ингибирование (в 2—3 раза) активности рибонуклеазы при пероральном действии 1/3, 1/5, 1/10 LD_{50} концентраций метилпиразола и карбамоилметилпиразола в острых экспериментах (однократный трехдневный прием). Аналогичная концентрация указанных ксенобиотиков не вызывает особых изменений в активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы I, между тем как активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы II, при тех же воздействиях, достоверно повышается (на 40—60%). Делается заключение о том, что высокие концентрации пиразоловых соединений выступают в качестве ингибиторов активности рибонуклеазы и индукторов активности нуклеоплазматической ДНК-зависимой РНК-полимеразы, синтезирующей РНК АУ типа (пре-м-РНК), содержание которого значительно (в 2—3 раза) увеличивается в мозгу при действии тех же пиразоловых соединений. Обсуждается механизм действия указанных препаратов.

Разработка молекулярно-биологических, физико-химических и энзимологических основ повреждения генетического аппарата клеток функционально активных органов, каковым является головной мозг, при действии синтетических химических соединений, широко применяемых в хозяйстве, является важнейшей задачей современной нейрoхимии и молекулярной токсикологии.

В наших прежних исследованиях было изучено действие пиразоловых соединений на количественную характеристику различных классов РНК в мозгу. Вредное влияние пиразоловых соединений на организм человека и животных занимает особое место в оценке экологического состояния определенных регионов и здоровья людей, занятых в производстве и применении указанных препаратов из группы ингибиторов нитрификации.

Рассмотрение результатов наших прежних исследований относительно действия метилпиразола и карбамоилметилпиразола на нуклеиновый обмен в головном мозгу в острых экспериментах показало значительное увеличение количества я-РНК АУ и GC типов, р-РНК и т-

РНК. При этом содержание я-РНК АУ типа (предшественник информационной РНК) возрастало в 2—3 раза. При подострых и хронических воздействиях указанных препаратов (1—3 месяца) в мозгу отмечалось подавление синтеза почти всех форм РНК, за исключением я-РНК АУ типа. Указанные изменения выявляли определенное перенапряжение в функции генетического аппарата нервных клеток при острых и хронических пиразоловых интоксикациях.

Попытки в расшифровке механизма изменений количественной характеристики различных классов РНК при острых и хронических пиразоловых интоксикациях привели нас к причинно-следственному рассмотрению изменений в активности ключевых ферментов биосинтеза и распада нуклеиновых кислот в головном мозгу при действии указанных соединений.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на белых крысах-самцах, массой 150—200 г. Экспериментальных животных в острых опытах подвергали пероральному влиянию пиразоловых соединений. Вводили 3-метилпиразол и 1-карбамоил-3,5-метилпиразол, в виде химически чистых препаратов в концентрациях 1/3, 1/5 и 1/10 ЛД₅₀ (однократный прием в течение трех дней). Половина летальной дозы препарата (ЛД₅₀) составляла 1920 мг/кг веса животного. В основу методов выделения, очистки и определения активности рибонуклеазы были положены исследования ряда авторов [1—3] в нашей модификации [4, 5]. Субклеточные частицы мозга (ядра, митохондрии, рибосомы и др.) выделяли методом дифференциального ультрацентрифугирования. В полученной суспензии субклеточных частиц определяли РНКазную активность по методу Mc Donald [6], Uchida, Egami [7], Takahashi [8]. Из различных субклеточных частиц мозга готовили инкубационную смесь, содержащую 0,2—0,3 мг белка (ядерного, рибосомного, надосадочной жидкости при 105000 g) в 0,4 мл, в которую добавляли 96 мг мочевины (конечная концентрация 4 M) и оставляли ее при 0° в течение 30 мин. Затем в среду вносили 0,4 мл РНК в ацетат-вероналовом буфере при pH 5,4, 6,0, 7,6, 7,9, 8,1 и инкубировали ее при 37° в течение 30 мин. Для осаждения неразложившейся РНК к пробам добавляли 0,1 мл перхлорной кислоты при 0°, через 30 мин их центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин, надосадочную жидкость разводили в 40 раз. Кислоторастворимые продукты расщепления РНК определяли в 10 мм кювете при 260 мкм. За единицу РНКазной активности принимали увеличение оптической активности на 1 ед. при длине волны 260 мкм в условиях опыта. Число ед. активности фермента выражали в мг ядерного, рибосомного белка и белка растворимой фракции. Ниже приводятся данные РНКазной активности ядерной фракции мозга при pH 6,0.

В основу определения активности фермента положены методы Albertson [9], Kornberg, Okasaki [10]. Выделение, очистку и определение активности фермента из мозга проводили по прописи Weiss [11]. Дебоза и Вогтрина [12] в нашей модификации. Активность фермента определяли включением радиоактивного рибонуклеозид-трифосфата в РНК в присутствии всех других необходимых нуклеозидтрифосфатов. Реакция полимеризации протекает в присутствии ДНК. После получения суспензии фермента в 0,05 трис-буфере, рН 8,1, в белковой концентрации 10—12 мг на мл суспензии, собирали инкубационную смесь, содержащую 100 мкмоль трис-НСI буфера, рН 8,1, 5 мкмоль $MgCl_2$, 10 мкмоль меркаптоэтанол, 2 мкмоль соответственно АТР, СТР, ГТР и 0,1 мкмоль меченой УТР [^{14}C] с У.А. 5— 10^6 Кт/мин/мкмоль. Количество включенной метки в РНК рассчитывали путем деления общего показателя, обнаруживаемого во фракции РНК (минус показание контроля), на У.А. меченого субстрата. Смесь инкубировали в 10 мл флаконах при 35° в течение 30 мин и реакцию останавливали добавлением равного объема 10%-ной ТХУ. В качестве носителя использовали 200 мкг БСА. Радиоактивность просчитывали на титре целлюлозных фильтров и выражали в нмоль [^{14}C]UMP/мг ДНК. Меченым нуклеотидом мог служить любой другой. Проводили дифференциальное определение активностей I и II форм РНК-полимераз [13]. Активность I формы РНК-полимеразы определяли в 250 мкл смеси, содержащей 75 мМ трис-НСI буфер, рН 8,0, 0,05 мМ ЭДТА, 0,08 мМ ДТТ, 1,5 мМ спермидин, по 32 мМ АТР, СТР и ГТР, 0,06 мМ немеченой УТР, 0,034 мМ [^{14}C] УТР (2 мКл) и 10 мМ $MgCl_2$. Количество вносимых в среду ядер рассчитывали исходя из 20—25 мкг по ДНК. При определении активности II формы РНК-полимеразы рН смеси снижали до 7,5, добавляли 320 мМ $(NH_4)_2SO_4$ и вместо $MgCl_2$ использовали 2 мМ $MnCl_2$. Инкубацию проводили при 37° в течение 20 мин, реакцию останавливали перенесением проб в ледяную баню, объем смеси доводили до 1 мл раствором немеченого носителя (200 мкг БСА на пробу) и добавляли равный объем 10%-ного раствора ТХУ с определенным радиоактивности по вышеописанному методу.

Результаты и обсуждение

Как вытекает из данных табл. 1, активность рибонуклеазы ядерной фракции мозга в контрольных опытах при рН 6,0 составляет $19,10 \pm 0,83$ ед., что соответствует литературным данным [4].

Действие метилпиразола и карбамоилметилпиразола в концентрации $1/3$ ЛД₅₀ вызвало многократное понижение активности рибонуклеазы в ядерной фракции мозга, составляя соответственно $5,72 \pm 0,40$ и $7,33 \pm 1,89$ ед. против $19,0 \pm 0,83$ ед. в контроле. Аналогичная закономерность, но с меньшей выраженностью, отмечается при действии указанных соединений и в концентрации $1/5$ ЛД, с активностью фермента, составляющей соответственно $10,25 \pm 0,97$ и $7,85 \pm 0,69$ ед.

Анализ полученных данных показывает значительное (2—3-кратное) подавление активности рибонуклеазы в ядерной фракции мозга

при действии высоких концентраций метилпиразола и карбамоилметилпиразола. В отличие от метилпиразола, карбамоилметилпиразол достоверно понижал активность рибонуклеазы и при действии сравнительно меньшей концентрации препарата (1/10 ЛД₅₀), составляя в контроле, по данным табл. 1, $12,33 \pm 1,12$ ед. против $19,10 \pm 0,83$ ед.

Таблица 1

Активность рибонуклеазы в ядерной фракции головного мозга при действии пиразоловых соединений (рН 6,0)

Конт- роль	Метилпиразол			Карб. моилметилпиразол		
	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀
19,10	5,72	10,25	18,05	7,33	7,85	12,33
$\pm 0,83$	$\pm 0,40$	$\pm 0,97$	$\pm 0,84$	$\pm 1,89$	$\pm 0,69$	$\pm 1,12$
n 12	8	8	12	8	8	8
p —	<0,001	<0,001	—	<0,001	<0,001	<0,001

Согласно полученным данным, испытанные нами пиразоловые соединения в условиях *in vivo* выступают в роли ингибиторов активности рибонуклеазы.

Сопоставление этих данных с ранее полученными по изучению количественных сдвигов в содержании различных классов РНК при тех же воздействиях позволяет проследить определенное соответствие. Подавление активности рибонуклеазы указанными препаратами, возможно, оказывает значительное индуцирующее действие на биосинтез я-РНК AU- и CG-типов, р-РНК и т-РНК в мозгу. С другой стороны, не исключено, что метилпиразол и карбамоилметилпиразол, в острых экспериментах в высоких и средних концентрациях, чувствительно подавляют или даже полностью приостанавливают катаболизм РНК, способствуя тем самым относительно накоплению различных форм РНК. По данным наших экспериментов, механизм ингибирования активности фермента в мозгу под действием пиразоловых соединений остается невыясненным и требует проведения специальных исследований в модельных системах, несмотря на полнейшую достоверность описанных фактов.

В проведенных исследованиях особый интерес представляло изучение динамики изменения активности РНК-синтезирующей системы (ДНК-зависимая РНК-полимераза) на фоне увеличения содержания различных форм РНК в мозгу при действии примененных соединений. Большим достижением в понимании регуляции биосинтеза различных классов РНК в эукариотических клетках было открытие множественных форм ядерных ДНК-зависимых РНК-полимераз [14], в частности РНК-полимеразы I и РНК-полимеразы II [14, 15], локализованных: первая — в основном в ядрышках клеток и отвечающая за синтез р-РНК, а вторая — в нуклеоплазме и синтезирующая я-РНК AU типа (предшественники информационной РНК). Изучение активности ука-

занных форм фермента ядерной фракции мозга проводили под действием 1/3, 1/5, 1/10 ЛД₅₀ метилпиразола и карбамоилметилпиразола.

Как показывают данные табл. 2, активность РНК-полимеразы I в контроле составляет $132,20 \pm 1,61$ нМ [¹⁴C] UMP на мг ДНК, которая под влиянием метилпиразола и карбамоилметилпиразола в концентрации 1/3 ЛД₅₀ достоверно понижается соответственно до $120 \pm 11,27$ и $102,50 \pm 3,05$ ед. Аналогичная картина была зарегистрирована и с применением 1/5 и 1/10 ЛД₅₀ концентраций изученных препаратов. Примечательно, что активность РНК-полимеразы I в указанных экспериментах не подвергается большим изменениям и колеблется в пределах контроля. По всей вероятности, как метилпиразол, так и карбамоилметилпиразол не доходят до ядрышкового аппарата клетки, где, фактически, располагается ДНК-зависимая РНК-полимераза I, обеспечивающая синтез р-РНК, а возможно и т-РНК, чем и можно объяснить отсутствие видимых изменений в активности РНК-полимеразы I.

Таблица 2

Активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы I в мозгу при действии пиразоловых соединений (нМ [¹⁴C] UMP на мг ДНК)

Контроль	Метилпиразол			Карбамоилметилпиразол		
	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀
$132,10 \pm 1,61$ n 6 p	$120,00 \pm 11,27$ 6 —	$119,60 \pm 7,57$ 6 —	$102,00 \pm 7,2$ 6 <0,05	$102,5 \pm 0,5$ 6 <0,05	$110,0 \pm 2,4$ 6 —	$110,0 \pm 9,66$ 6 —

Изучение изменений в активности РНК-полимеразы II при действии тех же соединений было предпринято на основании известной лимитирующей роли данной формы фермента в биосинтезе я-РНК АУ типа и наших ранее проведенных наблюдений, показавших значительный рост содержания я-РНК в мозгу при всех примененных концентрациях и формах затравки животных пиразоловыми препаратами.

По данным табл. 3, активность РНК-полимеразы II, составляющая в контроле $157 \pm 3,86$ ед. в острых опытах под действием метилпиразола и карбамоилметилпиразола возрастала соответственно до $254,0 \pm 17,0$ и $230 \pm 16,9$ ед.

Сопоставление полученных результатов с прежними по изучению количественных сдвигов в содержании различных форм РНК в мозгу при действии тех же концентраций исследуемых пиразоловых соединений, позволяет выявить однонаправленность в их течении. Нарастание активности РНК-полимеразы II во времени сопровождается со значительным ростом содержания различных форм РНК, в особенности я-РНК АУ типа. При этом обнаруживается полное причинно-следственное соответствие между уровнем активности фермента и содержанием синтезируемых им форм РНК.

Достоверное повышение активности РНК-полимеразы II отмечалось и при других, сравнительно меньших концентрациях пиразоловых соединений. Как показывают данные табл. 3, 1/5 и 1/10 ЛД₅₀ концентрации метилпиразола и карбамоилметилпиразола также вызывают достоверное повышение активности указанной формы фермента, составляющей соответственно $220,0 \pm 16,9$, $219,00 \pm 11,27$ и $201,0 \pm 12,9$, $204,0 \pm 12,0$ ед. против $157 \pm 3,86$ ед. в контроле.

Таблица 3

Активность ДНК-зависимой РНК-полимеразы II в мозгу при действии пиразоловых соединений (нМ [¹⁴C] UMP на мг ДНК)

Контроль	Метилпиразол			Карбамоилметилпиразол		
	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀	1/3 ЛД ₅₀	1/5 ЛД ₅₀	1/10 ЛД ₅₀
157 ±3,86 n 6 p —	254 ±17,0 6 <0,001	220 ±16,9 6 <0,01	219 ±11,27 6 <0,001	230 ±16,9 6 <0,001	201 ±12,9 6 <0,01	204 ±12,0 61 <0,00

Анализ полученных данных показывает, что пиразоловые соединения в острых экспериментах при высоких концентрациях выступают в качестве ингибиторов активности рибонуклеазы и индукторов активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы II, синтезирующей в основном я-РНК АУ типа.

На основании полученных данных можно допустить, что точкой приложения метилпиразола и карбамоилметилпиразола является нуклеоплазма нервных клеток, в которой проявляется эффект ингибирования рибонуклеазы и активирования нуклеоплазматической ДНК-зависимой РНК-полимеразы (полимераза II).

RIBONUCLEASE AND DNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE ACTIVITY IN BRAIN UNDER THE EFFECT OF PYRAZOLE COMPOUNDS.

KHACHATRIAN G. S., ANTONIAN A. A., KAZARIAN A. R., KHACHATRIAN V. G., GALSTIAN G. G., VAHRADIAN H. G.

Scientific Research Institute of Toxicology, Yerevan Medical Institute

An activity of ribonuclease, DNA-dependent RNA polymerase in rat brain cells during acute intoxication by pyrazole compounds was studied. It was shown a significant inhibition (2—3 times) of ribonuclease activity during per oral effect 1/3; 1/5; 1/15 LD₅₀ concentration of pyrazole and carbamoyl methylpyrazole in acute experiments (single three day reception). Analogical concentration of indicated xenobiotics haven't brought

to particular changes in the activity of DNA-dependent RNA polymerase I, when the activity of DNA-dependent RNA polymerase II under the same effects reliably increased (at 40—60%). It can be concluded, that great concentrations of pyrazole compounds appeared to be inhibitors of ribonuclease activity and inductors of the activity of nucleoplasmatic DNA-dependent RNA AU type (pre-m-RNA). Its content was significantly increased (2—3 times) in brain during the effect of the same pyrazole compounds. The mechanism of the action of indicated preparations was considered.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hirs et al. J. Biol. Chem., v. 235, p. 633, 1960.
2. Spackman et al; J. Biol. Chem., v. 235, p. 643, 1960.
3. Шапот В. С. Нуклеазы, Медицина, М. 1968.
4. Хачатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга, Айтастан, 1981.
5. Хачатрян Г. С., Антонян А. А., Алавердян А. А., Саркисян Ф. А., Вопр. биохимии мозга, т. 9, с. 151—170, 1974.
6. McDonald M. R. Meth. in Enzymology, v. 12, p. 428, 1955.
7. Uchida T. E., Egami F. Meth. in Enzymology, v. 12, p. 228—239, 1967.
8. Takahashi K. J. Biochem. (Tokyo); v. 49, p. 1, 1961.
9. Albertson P. A. Biochem. et biophys. acta, v. 103, p. 1, 1965.
10. Kornberg A., Okasaki T. J. Biol. Chem., v. 239, p. 259, 1964.
11. Weiss S. V. Meth. in Enzymology, v. 13, P. B. p. 555—565, 1967.
12. Дебов С. С., Вотрин И. И. Биохимия, т. 31, № 1, с. 125, 1966.
13. Гаузе Л. Н., Экизашивили В. К., Кафиани К. А. Биохимия, т. 45, с. 1017—1026, 1980.
14. Chambon P. Annu. Rev. Biochem., v. 144, p. 613—638, 1975.
15. Lindell T. J. Pharm. and Ther., v. 2, p. 195—222, 1977.

Поступила 12. VI, 1991.

УДК 577.113.576.315.612.82

ВЛИЯНИЕ БЕЛКОВ ЦИТОЗОЛЯ ЭМБРИОНАЛЬНОГО
И ВЗРОСЛОГО МОЗГА НА ДНК-ПОЛИМЕРАЗНУЮ
АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ ЯДЕР МОЗГА

ИВАНОВ А. П., КАПРАЛОВ А. А., БАРЫК О. Я., ГУБЧЕНКО С. В.

Институт биоорганической химии и нефтехимии АН Украины, Киев

Исследовали влияние цитозоля мозга и его фракций, полученных осаждением сульфатом аммония и ионообменной хроматографией на ДЭАЭ сефадексе А-50, на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер. Обнаружены различия в действии суммарного цитозоля мозга эмбрионов, новорожденных и взрослых животных на включение метки в ДНК. В цитозоле мозга эмбрионов крупного рогатого скота обнаружен ряд фракций, увеличивающих ДНК-полимеразную активность изолированных ядер. При этом соответствующие фракции, выделенные из цитозоля взрослого мозга такого действия не оказывают. Наряду с этим выделены фракции, обладающие противоположным действием: ингибирующим при выделении из цитозоля эмбрионов и активирующим при выделении из цитозоля взрослого мозга. Было проведено сравнительное исследование этих фракций на РНК-полимеразную активность. Предполагается, что некоторые из выделенных фракций могут принимать участие в процессах репликации ДНК и пролиферации, происходящих в клетках эмбрионального мозга.

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что в различных тканях организма содержатся вещества, способные оказывать влияние на процессы пролиферации клеток. Такие соединения обнаружены, в частности, среди растворимых компонентов тканей, экстрагируемых из них буфером с низкой ионной силой [1, 2] и, по-видимому, входящих в состав цитоплазмы. В их состав входят наряду с низкомолекулярными модуляторами [3] ряд белков, обладающих способностью как активировать [4, 5], так и ингибировать пролиферацию [6, 7]. Однако в настоящее время эти белки не выделены и механизмы их действия окончательно не установлены. Одним из подходов к выделению белков, участвующих в регуляции пролиферации может быть исследование механизмов репликации ДНК. Известно, что удвоение молекулы ДНК является необходимым условием начала деления клетки. В связи с этим можно предположить, что белки, оказывающие влияние на синтез ДНК играют определенную роль и в регуляции клеточного деления.

Показано, что в процессах синтеза ДНК, наряду с ДНК-полимеразой—ферментом, непосредственно осуществляющим реакцию синтеза участвует ряд регуляторных белков, среди которых обнаруживаются

как активирующие [8, 9], так и ингибирующие [10, 11] синтез ДНК. По крайней мере, некоторые из этих белков имеют цитоплазматическую природу [11, 12].

Хорошей моделью для выделения белков, оказывающих влияние на синтез ДНК и исследования их возможной связи с пролиферативной активностью являются клетки головного мозга, характеризующиеся этим свойством на эмбриональной стадии и в течение раннего постнатального периода развития [13, 14] и значительным падением ее уровня на последующих стадиях эмбриогенеза [15]. Вероятно, одной из причин изменения интенсивности течения процессов репликации клеток мозга в ходе развития могут быть сдвиги в качественном и количественном содержании белков цитозоля, принимающих участие в репликации ДНК.

Исходя из данных о присутствии в составе цитозоля белков, участвующих в регуляции клеточного деления и синтеза ДНК, исследовали влияние суммарного цитозоля мозга животных и отдельных фракций белков цитозоля на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер мозга и попытались выделить фракции, оказывающие воздействие на этот показатель. Для выявления белков с различным эффектом действия в зависимости от стадии развития животного, что может быть обусловлено происходящими при этом изменениями процессов репликации, нами также были предприняты исследования по изучению сравнительного действия белков цитозоля, выделенных из мозга эмбрионов и взрослых коров.

Материалы и методы

В работе использовали мозг эмбрионов и взрослых особей крупного рогатого скота, а также крыс-самцов массой 150—200 г.

Ядра мозга и печени получали по описанному методу [16], ткань гомогенизировали в 0,25 М сахарозе, приготовленной на ТКМ-буфере (50 мМ трис-НСI, рН 7,4, 25 мМ КСI, 5 мМ MgСI₂). Для получения цитозоля гомогенат ткани, приготовленный с использованием ТКМ-буфера в соотношении 1:4 центрифугировали при 800g в течение 10 мин, надосадочную жидкость центрифугировали последовательно при 15000g 15 мин и 103000g 2 ч.

При осаждении цитозоля сульфатом аммония использовали его концентрации, составляющие 25%, 50%, 75% от насыщения. Полученные фракции после диализа подвергали ионообменной хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе А-50, с использованием в качестве буфера наанессии 0,1 М NaCl, 20 мМ трис-НСI (рН 7,4), 1 мМ ЭДТА. Элюцию осуществляли ступенчатым градиентом NaCl, приготовленным на том же буфере, используя концентрации 1 М, 1,5 М и 2 М.

Изучение транскрипции в изолированных ядрах проводили по методу [17]. При этом инкубационная среда содержала 0,12 М КСI, 0,25 мМ Mg ацетат, 0,5 мМ каждого из нуклеозидтрифосфатов—АТФ,

СТР, dGTP, и 0,05 мМ Н-УТР (удельная радиоактивность 940 ТБк/моль).

При определении ДНК-полимеразной активности среда инкубации содержала 50 мМ трис-НСI (рН 7,4), 6 мМ MgCl₂, 15 мМ KCl, 6 мМ меркаптоэтанол, 2 мМ АТР, по 200 мкМ каждого из dАТР, dСТР, dGTP и 20 мкМ [С]—dTTP.

При определении как РНК-, так и ДНК-полимеразной активности инкубационная среда, конечный объем которой составлял 100 мкл, содержала 50 мкл суспензии ядер при концентрации 1—2 мг, ДНК/мл и 25—35 мкг белка исследуемой фракции. Температура инкубации составляла 25°C в случае исследования РНК-полимеразной активности и 37°C при исследовании ДНК-полимеразной активности. По окончании времени инкубации аликвоты наносили на диски фильтровальной бумаги Whatman 1 мм, которые помещали в охлажденную на льду 10% ТХУ и 1% пирогосфат натрия (из расчета 15—30 мл на 1 фильтр) и инкубировали во льду 10 мин. Раствор сливали и фильтры ополаскивали 2 раза по 5 мин раствором 5% ТХУ—1% пирогосфат натрия, затем ацетоном высушивали на воздухе и определяли радиоактивность, используя сцинтилляционную жидкость ЖС-1. Определение количества белка проводили по Lowry и соавт. [13], а их электрофорез осуществляли на ПААГ [14] с использованием градиента концентрации акриламида 7,5—22%.

Результаты и обсуждение

При исследовании эндогенной ДНК-полимеразной активности изолированных ядер мозга и печени взрослых крыс в зависимости от времени инкубации обнаружен линейный характер реакции в течение первых 30 мин с последующим выходом на плато (рис. 1), в связи с чем дальнейшие исследования проводили при экспозиции 30—40 мин. Примечательно, что в этих экспериментах ядра мозга проявляют значительно более низкую эндогенную ДНК-полимеразную активность по сравнению с ядрами в печени в полном соответствии с данными литературы о низком уровне синтеза ДНК в этой ткани [18, 19]. При исследовании влияния на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер мозга эмбрионов, новорожденных и взрослых крыс, а также печени последних суммарного цитозоля этих тканей, обнаружен стимулирующий эффект цитозолей мозга новорожденных и печени на этот фермент во всех исследованных ядрах (рис. 2). Цитозоль мозга взрослых крыс стимулировал ферментативную активность лишь ядер эмбрионов, а цитозоль мозга эмбрионов приводил к увеличению включения метки в ядра мозга эмбрионов и его уменьшению в ядрах печени. Полученные результаты соответствуют данным литературы об изменении интенсивности течения реакций синтеза ДНК в процессе онтогенеза и присутствии в экстракте эмбриона мозга факторов, модулирующих ДНК-полимеразную активность [4, 15, 20].

Обнаруженный во всех случаях эффект активации ДНК-полимеразной активности цитозолей мозга новорожденных и цитозоля печени, по-видимому, связан с достаточно высоким уровнем синтеза ДНК, наблюдаемым в печени и мозгу новорожденных животных [18, 19]. По всей вероятности, этот факт может свидетельствовать об определенном сходстве механизмов действия факторов цитозоля мозга и печени и отсутствии зависимости характера их действия от тканевой специфичности.

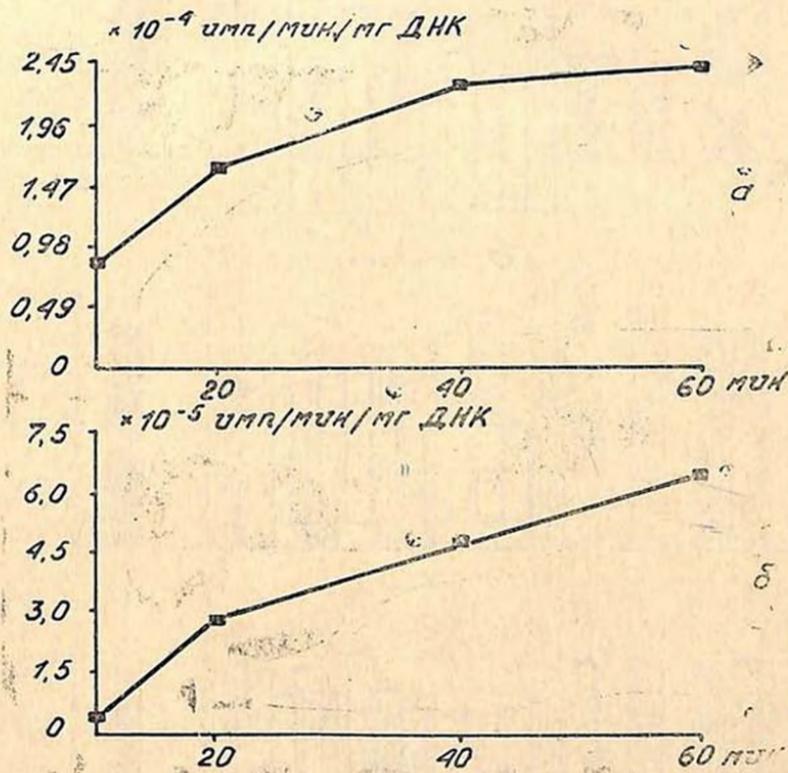


Рис. 1. Зависимость ДНК-полимеразной активности изолированных ядер от времени инкубации: а—ядра клеток мозга крыс, б—ядра клеток печени крыс.

Исходя из предположения, что обнаруженные различия в действии на ДНК-полимеразную активность цитозолей мозга взрослых и эмбрионов могут быть обусловлены различиями в их белковом составе, мы предприняли попытку выделить отдельные фракции белков цитозоля и выявить особенности их действия на ДНК-полимеразную активность ядер с отмеченной целью. После осаждения цитозоля мозга эмбрионов крупного рогатого скота и взрослых коров различными концентрациями сульфата аммония полученные фракции подвергли ионообменной хро-

матографии с обозначением вначале концентрации сульфата аммония, которой эта фракция осаждалась, затем концентрации соли, которой она элюировалась с сорбента (фракцию, не осаждаемую 75%-ным сульфатом аммония, обозначали п. 75).

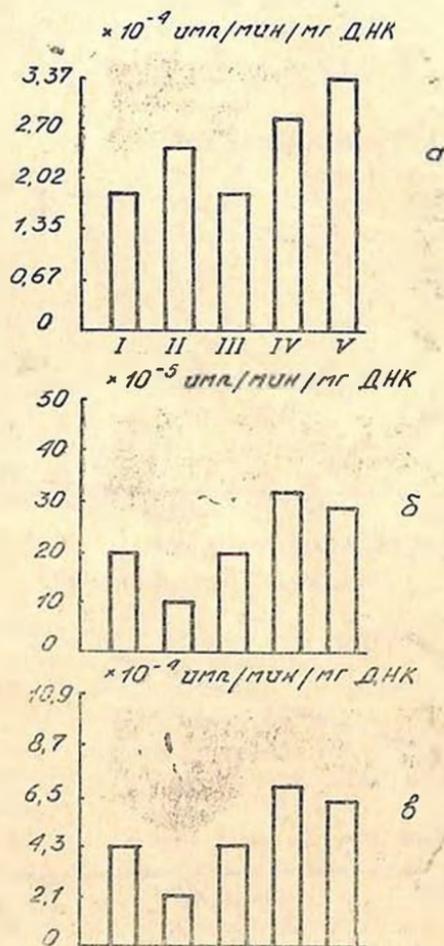


Рис. 2. Влияние цитозоля на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер: а—ядра мозга взрослых крыс; б—ядра эмбрионального мозга крыс; в—ядра печени крыс. I—без добавок; добавление цитозоля: II—эмбрионального мозга, III—взрослого мозга, IV—мозга новорожденных, V—печени.

При анализе влияния фракций, полученных из цитозоля эмбрионального мозга на ДНК-полимеразную активность ядер, выявлены две фракции, увеличивающие этот показатель при добавлении в инкубационную среду, содержащую ядра как эмбрионального и взрослого мозга коров, так и мозга крыс (рис. 3, 4). К ним относятся фракции

$\times 10^{-4}$ умр/мгн / мг ДНК

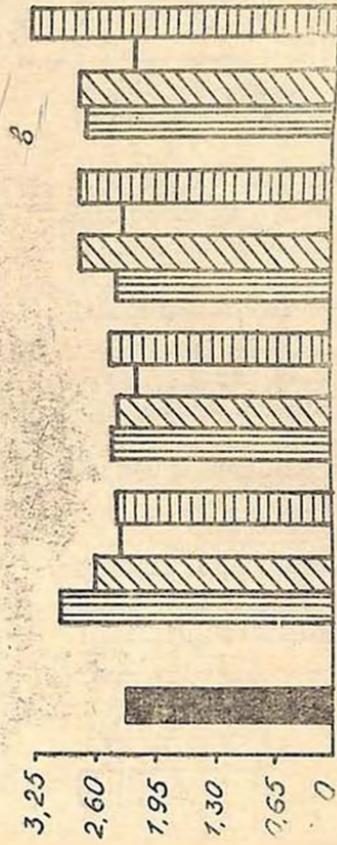
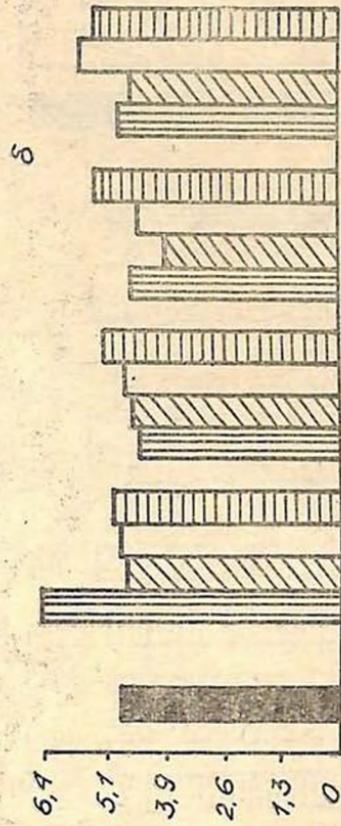
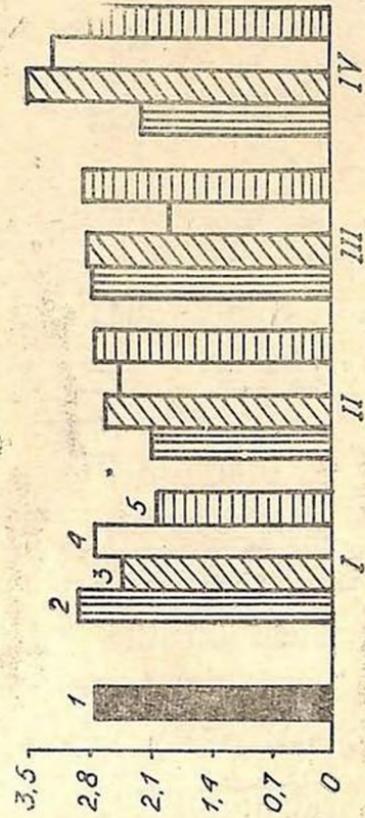


Рис. 3. ДНК-полимеразная активность, изолированных ядер в присутствии фракций, полученных после хроматографии на ДЭАЭ-сепадексе цитозоля эмбрионального мозга: *а*—ядра мозга крупного рогатого скота, *б*—ядра мозга эмбриона теленка, *в*—ядра мозга крысы. Здесь и на рис. 4, 5 1—V—фракции, элюируемые 0,1 М NaCl, 1,0 М NaCl, 1,5 М NaCl и 2,0 М NaCl соответственно, 1—контроль, 2—25, 3—50, 4—75, 5—сывяше 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

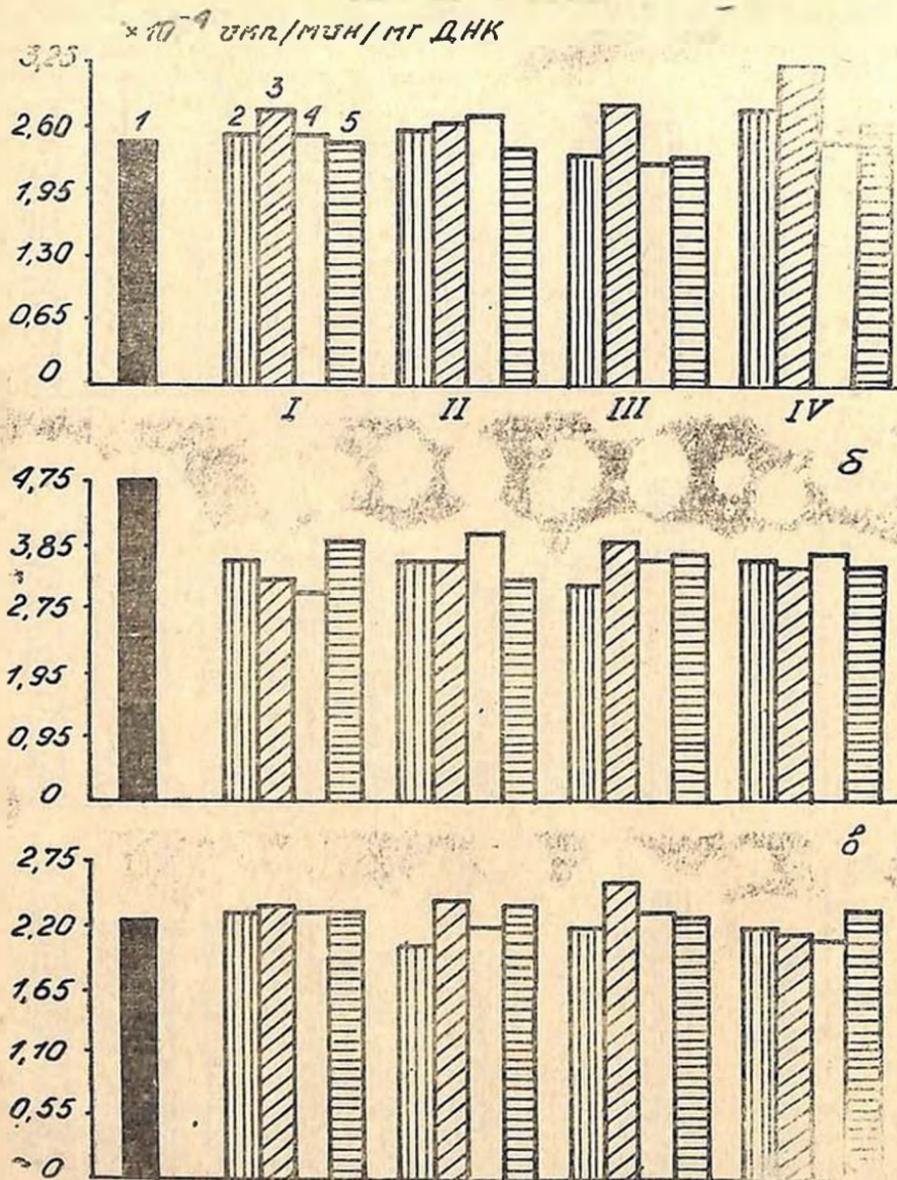


Рис. 4. ДНК-полимеразная активность изолированных ядер в присутствии фракций, полученных после хроматографии на ДЭАЭ-сефадексе цитозоля взрослого мозга. а—ядра мозга крупного рогатого скота; б—ядра мозга эмбриона телянка; в—ядра мозга крысы.

25.0,1; п. 75.1,5, а фракция 75.2 характеризуется активирующим действием при использовании ядер мозга эмбрионов крупного рогатого скота и взрослых коров. Среди других интерес представляет фракция 50.1,5, ингибирующая ДНК-полимеразную активность всех исследованных ядер и ряд фракций различного действия в зависимости от места выделения ядер.

Полученные данные позволяют заключить о присутствии в цитозоле эмбрионального мозга факторов как активирующих ДНК-полимеразную активность, так и ингибирующих в зависимости от тканевой принадлежности ядер и стадии их развития.

Изучение эффектов аналогичных фракций, выделенных из цитозоля взрослого мозга, на ДНК-полимеразную активность обнаружило ингибирующее действие или полное отсутствие какого-либо влияния на этот фермент. Исключения составляли лишь фракции 50.0,1; 50.1,5; 50.2,0; п. 75.2,0; в случае ядер крупного рогатого скота и фракция 50.1,5 в случае использования ядер мозга крыс.

Примечательно, что фракции 25.0,1; п. 75.1,5; 75.2,0, выделенные из цитозоля взрослого мозга, не оказывают стимулирующего действия на ДНК-полимеразную активность ядер в отличие от соответствующих фракций цитозоля мозга эмбриона. Наряду с этим, в цитозоле взрослого мозга присутствуют и другие фракции, действие которых на ДНК-полимеразную активность ядер отличалось от такового соответствующих фракций цитозоля эмбрионального мозга. Так, например, в этом случае фракция 50.1,5 оказывает стимулирующее действие на активность изученного фермента.

При исследовании влияния выделенных фракций на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер мозга крысы и эмбриона теленка (рис. 5) были обнаружены противоречивые результаты. Несмотря на однотипность эффектов ряда фракций (например, фракции 50.1,5) в отношении ДНК- и РНК-полимеразной активности изолированных ядер, большая часть их демонстрирует противоположное влияние на эти активности (в том числе, фракции 25.0,1 и п. 75.1,5), и причиной которого может быть существование разных механизмов действия этих факторов. По нашему мнению, те из исследованных фракций, которые обладают сходным действием на обе эти активности, действуют неспецифически, влияя на процессы, общие для этих двух реакций. Они могут воздействовать на структуру хроматина, оказывать влияние на активность ферментов, связанных с обменом нуклеотидов, принимать участие в процессах транскрипции, предшествующей репликации и т. д. В состав же фракций (25.0,1; п. 75.1,5), оказывающих влияние на ДНК- и не влияющих на РНК-полимеразную активность, могут входить белки, действующие непосредственно на процесс синтеза ДНК. При их электрофоретическом исследовании обнаружен достаточно гетерогенный белковый состав (данные не представлены). Последнее не позволяет полностью исключить возможность маскирования в цитозоле взрослого животного действия белков, влияющих на

синтез ДНК за счет изменения количества других белков, входящих в состав этих фракций.

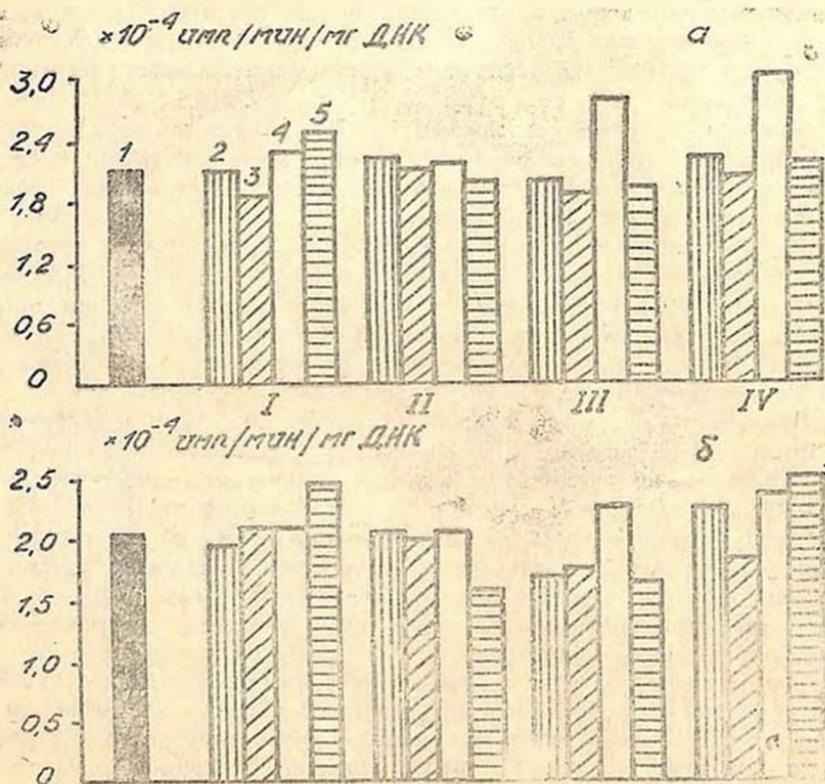


Рис. 5. ДНК-полимеразная активность изолированных ядер в присутствии фракций, полученных после хроматографии на ДЭАЭ-соединение цитозоля эмбрионального мозга. а—ядра мозга крысы; б—ядра мозга крупного рогатого скота.

Таким образом, полученные данные позволяют прийти к выводу, что в цитозоле эмбрионального мозга содержится ряд фракций, действие которых на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер мозга отличается от действия соответствующих фракций цитозоля мозга взрослых животных. К ним относятся например, фракции 25.0.1; п. 75.1.5; 50.1.5.

Учитывая данные о том, что предшествующий клеточному делению репликативный синтез ДНК происходит в основном в клетках эмбрионального мозга, составляя там около 90% общего синтеза ДНК [18], а в мозге взрослых животных имеет место, главным образом, репаративный синтез ДНК [21], можно предположить, что в состав этих фракций входят белки, действие которых связано с увеличением про-

лиферативной активности. Среди них могут быть как ДНК-полимераза или ее субъединицы, так и белки, регулирующие ее активность.

Исходя из того, что интересующие нас белки оказывают влияние на синтез ДНК, можно предположить, что их можно дополнительно очистить с помощью методов, используемых для выделения ДНК-связывающих белков. Имеющиеся в литературе данные о связи пролиферации и дифференцировки клеток позволяют предположить, что исследование этих белков может также способствовать выяснению молекулярных механизмов процесса дифференцировки [22].

В то же время необходимо подчеркнуть, что далеко не все процессы синтеза ДНК, протекающие в клетках мозга, связаны с пролиферацией, они могут иметь прямое отношение и к происходящему в ядрах нейронов повышению количества ДНК с 2 до 3,5n (n—количество ДНК в гаплоидном наборе хромосом) [23]. К особенностям синтеза ДНК в мозгу относится также интенсивное включение радиоактивных предшественников в строгие этапы синтеза и столь же быстрое их исчезновение, что предположительно можно связать с наличием в мозгу быстро обменивающейся фракции ДНК [23]. Таким образом, для доказательства правомерности влияния изученных нами фракций, воздействующих на синтез ДНК и процессы пролиферации, необходимо проведение специальных исследований на уровне культуры клеток.

THE ACTION OF CYTOSOL PROTEINS OF EMBRYONAL AND ADULT BRAIN ON DNA-POLYMERASE ACTIVITY OF BRAIN NUCLEI.

IVANOV A. P., KAPRALOV A. A., BARYK O. Y., GUBCHENKO S. V.

Institute of Bioorganic Chemistry and Oil Chemistry, Acad.
Sci. of the Ukraine, Kiev

It was studied the action of cytosol and its fractions obtained by the precipitation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and ion-exchanger chromatography on DNA-polymerase activity of isolated nuclei. We observed the discrepancies in the action of total cytosol of embryonal, newborn or adult animals on the label's incorporation in DNA. It was found some fractions increased DNA-polymerase activity of isolated nuclei in the embryonal cytosol. The same fractions obtained from the adult cytosol didn't act in such a way. There were obtained also some fractions acted in the opposite way. They inhibited DNA-polymerase activity when obtained from the embryonic cytosol and activated it when obtained from the adult cytosol. We have studied also the influence of these fractions on RNA-polymerase activity. It was suggested that the investigated fractions were able to take part in the processes of DNA replication in embryonal brain cells.

1. *Gospodarowicz D., Moran J.* Annu. Rev. Biochem., v. 45, p. 531—558, 1976.
2. *Витакер А.* Среды для культивирования клеток млекопитающих. Новые методы культивирования животных тканей, М., Наука, с. 7—36, 1976.
3. *Кусень С. И., Стойка Р. С.* Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста, М., Наука, с. 236, 1985.
4. *Li I., Ozawa E., Dev, Growth, Differ.* v. 27, p. 717—728, 1985.
5. *Sensenbrennen M., Labourdette G., Pettmann B., Perrault F., Beznard F. J., Physiol.*, v. 82, p. 288—293, 1987.
6. *Sharifi B. G., Johnson T. C., Khurana V. K., Bascom C. C., Pleenor T. J., Chou H. H. J.* Neurochem., v. 46, p. 461—469, 1986.
7. *McMahon J. B., Farrelly J. G., Thomas type P.* Proc. Nat. Acad. Sci. v. 79, p. 451—455, 1982.
8. *Roberts J. M., D'Urso G.* Science, v. 214, № 4872, p. 1486—1489, 1988.
9. *Myers Ch. A., Patel P. I., Miller M. R.* Exp. Cell. Res., v. 143, p. 227—236, 1983.
10. *Roberts J., Weintraub H.*—In: Eucaryotic DNA Replicat., Cold Spring Harbor (N. Y.), p. 191—196, 1988.
11. *Rao P. N., Sunkara P. S.*—In: Cell. Cycle Regul., New York e a p. 133—147, 1978.
12. *Limas O. J.* Amer. J. Physiol., v. 238, № 1, H66—H72, 1980.
13. *Lowry O. H., Rezebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J.* Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
14. *Laemmli U. K.* Nature, v. 227, № 5259, p. 680—686, 1970.
15. *Mastromei G., Eliasson R., Reichard P. J.* Mol. Biol., v. 151, p. 627—643, 1981.
16. *Гюленев В. Н., Капралов А. А., Белик Я. В., Смерчинская Л. С., Биохимия*, т. 48, № 5, с. 827—832, 1983.
17. Транскрипция и трансляция. Методы.—М. Мир, 1987.
18. *Третьяк Т. М.* Успехи соврем. биол., т. 100, вып. 1(4), с. 20—28, 1985.
19. Biochemical correlates of brain structure and function (ed. A. N. Davidson, I...), N. Y., San Francisco, Acad. Press, 1976.
20. *Laskey R.* Mol. Cell. Biol. Int. Repts., v. 7, p. 547—548, 1983.
21. *Korr H., Schultze L.* Exp. Brain Res., v. 74, 3, p. 573—578, 1989.
22. *Nishimuni Y., Kosaka M., Nishina Y., Sumi T., Sakuda M., Takeda M., Masu-moto K.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 163, № 3, p. 1290—1297, 1989.
23. *Ашапкин В. В., Ванюшин Б. Ф.* Успехи совр. биол., т. 33, вып. 3(6), с. 323—328, 1984.

Поступила 22. XI. 1991.

УДК 577.152.3

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА *Bryonia alba* НА
ПРОТЕИНАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ И СИНТЕЗ БЕЛКОВ
ГОЛОВНОГО МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС

АПРИКЯН А. Г., КОЧАРЯН Н. В.

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

В экспериментах *in vivo* и *in vitro* изучено влияние экстракта *Bryonia alba* на активность протеникиназ и синтез белков головного мозга и печени крыс. Показано стимулирующее действие экстракта на активность как сАМР-зависимых, так и сАМР-независимых протеникиназ, что, по-видимому, указывает на участие в этом процессе различных вторичных мессенджеров.

Установлено, что экстракт существенно увеличивает включение [³⁵S]метионина в ТХУ-нерастворимую фракцию головного мозга крыс. На электрофореграмме субклеточных фракций печени крыс, получавших экстракт, обнаружены определенные изменения белкового спектра. При этом ядерная фракция характеризуется несколько пониженным, а микросомальная фракция—повышенным уровнем экспрессии некоторых белков.

В последнее время в современной науке все большее внимание уделяется поиску и исследованию лекарственных средств растительного происхождения, среди которых большое место занимают тонизирующие и стимулирующие средства. К ним относится, в частности, растение *Bryonia alba*, с успехом применяемое в народной медицине различных стран, характеризуется довольно широким диапазоном терапевтического действия и прошедшее длительную проверку временем [1—3].

Химический состав корней растения *Bryonia alba* представлен такими соединениями, как кукурбитацины и их гликозиды, имеющие структурное сходство с глюкокортикостероидами, ряд жирных кислот, стерныи, пентациклические тритерпеновые кислоты, а также тригидроксиоктадекадиеновые кислоты, проявляющие простагландиноподобную активность [4].

Исследования нашей лаборатории по изучению регуляции синаптической активности головного мозга белых крыс показали резко ингибирующее действие экстракта *Bryonia alba* на синаптический захват нейромедиаторных аминокислот, стимулируя вместе с тем процесс их высвобождения из синапсом головного мозга [5]. Нами было показано [6], что это явление сопровождается повышением активности

аденилатциклазы мозга и увеличением внутриклеточного уровня сАМР.

В эукариотических системах действие сАМР опосредуется через сАМР-зависимые протенинкиназы [7], которые играют ключевую роль в регуляции клеточной активности [8—10]. Кроме того, увеличение внутриклеточного пула сАМР приводит к экспрессии ряда метаболически важных ферментов, таких как фосфоенолпируваткарбокениназа [11], тирозинаминотрансфераза [12] и другие [13, 14].

Исходя из вышесказанного, представлялось целесообразным изучение влияния экстракта *Vigna alba* на протенинкиназную активность мозга и спектр синтезированных белков мозга и печени крыс; результаты этих исследований представлены в настоящей работе.

Материалы и методы

Исследования проводили на белых крысах-самцах линии *Wistar* массой 150—200 г. Животных декапитировали, быстро отделенный головной мозг (без мозжечка), освобождали от кровеносных сосудов и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (8 строк при 800 об/мин) в 15 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,6, содержащем 0,25 М сахарозы, 20 мМ КСl, 12 мМ MgCl₂ и 2 мМ ЭДТА. Полученный 12%-ный гомогенат фильтровали через 4 слоя марли и использовали в системе синтеза белка.

Субклеточные фракции печени крыс получали методом дифференциального центрифугирования согласно методу Porcellati и соавт. [15]. Электрофорез осуществляли в ПААГ [16].

Синтез белка. Инкубационная смесь (1 мл) содержала 15 мМ КН₂РO₄, pH 7,6, 0,25 М сахарозы, 20 мМ КСl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ АДР; 2 мМ ЭДТА, 0,02%-ного БСА, 0,188 мг/мл смеси аминокислот, 6 мг белка, 2 мкКи [³⁵S] метионина и различные концентрации экстракта *Vigna alba* (от 10⁻⁶ мг/мл до 10 мг/мл). Используемая смесь L-аминокислот содержала 6,6% аланина, 2,0% аргинина, 4,9% аспарагиновой кислоты, 1,6% аспарагина, 8,8% цистина, 10,9% глутаминовой кислоты, 8,4% глутамина, 5,5% глицина, 2,9% гистидина, 1,5% изолейцина, 5,8% лизина, 11,2% лейцина, 1,7% фенилаланина, 2,1% пролина, 5,9% серина, 4,4% треонина, 3,8% триптофана, 7,5% тирозина и 4,4% валина.

Образцы инкубировали при 32° в течение 40 мин при непрерывном перемешивании в открытых центрифужных пробирках. Реакцию останавливали перенесением их на лед. К пробам добавляли охлажденную ТХУ до конечной концентрации 10% и переносили на фильтры Whatman 3ММ, промывая их еще 15 мл 5% ТХУ. Фильтры сушили при комнатной температуре и радиоактивность измеряли во флаконах с толуольным сцинтиллятором на счетчике CG-40 («Intertechnique», Франция).

Протенинкиназная активность. Для определения фосфотрансферазной активности мозг (без мозжечка) гомогенизировали в микрогомо-

генизаторе (стекло-стекло), используя 50 мМ НЕРЕС-буфер, рН 7,6, из расчета 2 мл буфера на 0,1 г свежей ткани. Гомогенат центрифугировали на холоду при 10 000 г в течение 5 мин. В полученном супернатанте концентрацию белка доводили буфером гомогенизации до 4 мг/мл и использовали в дальнейшем для определения протенинкиназной активности. Было исследовано три вида протенинкиназной активности: общей, сАМР-независимой (в присутствии 0,5 мг/мл специфического ингибитора сАМР-зависимой протенинкиназы) и сАМР-стимулируемой (в присутствии 10 мкМ сАМР).

Реакцию фосфорилирования [17] проводили с некоторыми модификациями. Инкубационная смесь (80 мкл) содержала 100 мкг белков цитозоля мозга, 50 мМ НЕРЕС-буфер, рН 7,6, 10 мМ $MgCl_2$, 50 мкМ [γ - ^{32}P] АТР, 20 мкг гистона Н1, различные концентрации экстракта *Bryonia alba* в присутствии или отсутствии протенинкиназного ингибитора или сАМР.

После преникубации при 4° в течение 15 мин реакцию фосфорилирования инициировали добавлением 50 мкМ АТР, содержащей 0,5 мкКи [γ - ^{32}P] АТР (> 1000 Ки/ммоль) и смесь инкубировали при 30° в течение 10 мин и останавливали перенесением образцов на лед и затем на фильтры Whatman 3ММ с немедленным погружением в холодный раствор 10%-ной ТХУ, содержащий 2% пирофосфата Na. Фильтры промывали в указанном растворе в течение 30 мин. Аналогичные промывки повторяли трижды, после чего фильтры заливали смесью ацетон-этанол (1:1) на 5 мин, затем чистым ацетоном и высушивали при комнатной температуре, просчитывая радиоактивность во флаконах с толуольным сцинтиллятором. Протенинкиназную активность выражали в пмоль перенесенного на гистон Н1 α -фосфата за 1 мин на мг ферментного белка.

Концентрацию белка определяли по методу Lowry [18].

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано дозозависимое увеличение уровня сАМР мозговой ткани под действием экстракта *Bryonia alba* в присутствии ингибитора ФДЭ циклических нуклеотидов [6]. При этом отмечалось более чем 2-кратное возрастание активности аденилатциклазы. Поскольку эффект сАМР проявляется через действие сАМР-зависимых протенинкиназ [7], логическим продолжением работы являлось исследование протенинкиназной активности мозга в этих условиях. Нами было исследовано три вида протенинкиназной активности: общая нестимулированная, сАМР-независимая (в присутствии специфического ингибитора сАМР-зависимой протенинкиназы) и сАМР-стимулированная (в присутствии сАМР). Результаты этих исследований представлены на рис. 1.

Как видно из рисунка, экстракт *Bryonia alba* повышает активность как сАМР-зависимых, так и сАМР-независимых протенинкиназ. При этом, если экстракт в концентрации 1 и 5 мг/мл повышает актив-

ность сАМР зависимых протеникиназ на 58 и 130% соответственно, то его стимулирующее действие на активность сАМР-независимых протеникиназ более выражено и составляет 94% и 188%, соответственно. Такое сопряженное стимулирующее действие экстракта на сАМР-зависимые и сАМР-независимые протеникиназы связано прежде всего с присутствием в экстракте физиологически активных соединений, как ингибирующих рост опухоли [19], так и обладающих простагландиноподобной активностью [4]. Кроме того, полученные данные указывают на возможное участие в этом процессе различных вторичных мессенджеров, хотя аналогичный эффект был обнаружен и в работе Anderson [20], где была показана двунаправленность действия некоторых физиологически активных соединений.

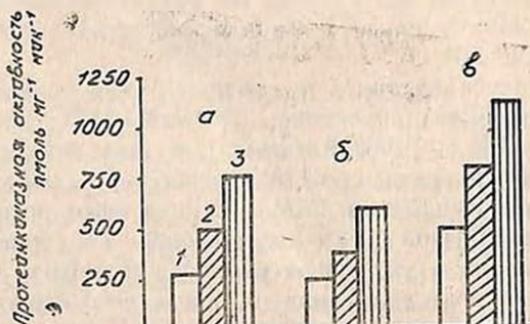


Рис. 1. Влияние экстракта *Bryonia alba* (ЭБА) на протеникиназную активность мозга крыс, а — суммарная протеникиназная активность, б — сАМР-независимая протеникиназная активность, в — сАМР-стимулированная протеникиназная активность. 1 — базальная активность, 2 — стимулированная 1 мг/мл ЭБА, 3 — стимулированная 5 мг/мл ЭБА; $p < 0,01$.

В научной литературе описано довольно много случаев, когда то или иное изменение в протеникиназной активности напрямую коррелировало с экспрессией или изменением уровня экспрессии ряда генов, что фиксировалось обнаружением соответствующих изменений в спектре синтезированных белков [21, 22]. Поэтому представлялось целесообразным изучение влияния экстракта *Bryonia alba* на синтез белков мозга.

Изучение синтеза белка проводилось с использованием гомогената мозга, профильтрованного через 4 слоя марли. Полученные результаты показали, что в присутствии экстракта *Bryonia alba* в концентрации 5 мг/мл наблюдается значительное увеличение синтеза белков мозга. Наблюдаемое увеличение включения [^{35}S]-метионина в белок превышает контрольный уровень примерно в 2 раза. При этом оптимальная концентрация экстракта совпадает с максимально эффективной концентрацией в экспериментах как по влиянию на уровень сАМР и активность аденилатциклазы, так и по стимулирующему действию на протеникиназную активность мозга.

Поскольку синтез белка осуществляется в основном в цитоплазме (микросомы, митохондрии), то было интересно изучить этот эффект в системе, не содержащей ядра. С этой целью ядра осаждали центрифугированием гомогената при 1500g в течение 20 мин и полученный супернатант исследовали в аналогичной системе синтеза белка. Как видно из кривой 3 рис. 2, концентрационная зависимость влияния экстракта *Gyneria alba* на синтез белка дает картину, сходную с кривой зависимости синтеза белка в системе с использованием исходного гомогената. Интересно, что в этом случае максимальное включение [³⁵S] метионина в белок, наблюдаемое при концентрации 5 мг/мл, значительно превышает уровень включения метки в белок, синтезированный в гомогенате мозга (рис. 2). Это объясняется скорее всего возможным присутствием в исходном гомогенате некоторых ядерных факторов, способных транслоцироваться в цитоплазму и либо оказывать модулирующее влияние на процесс трансляции, либо же блокировать действие физиологически активных соединений экстракта.

Обнаруженный эффект по изменению скорости трансляции белков может стать результатом изменения спектра синтезированных белков, что было проверено в экспериментах *in vivo*.

Субклеточные фракции печени крыс, получавших экстракт, были подвергнуты электрофоретическому разделению в ПААГ с использованием ДДС-Na. Результаты этой серии экспериментов на электрофореграмме показали, что в ядерной фракции печени крыс, получавших экстракт, обнаруживаются белки с M_r 50, 30 и 17 кД с уровнем экспрессии ниже контрольного. В то же время в микросомальной фракции видно как белки с повышенным уровнем экспрессии (с M_r 47, 33 и 12 кД), так и белки, в основном низкомолекулярные (с M_r 20, 18 и 15 кД), практически отсутствующие в микросомальной фракции контрольных животных. Планируются исследования по идентификации этих белков и изучению их физико-химических свойств.

Обнаруженный эффект экстракта *Gyneria alba* может являться следствием активации таких процессов, как репликация и/или транскрипция. Ответ на этот вопрос будет дан в последующих экспериментах.

Изменения в уровне транскрипции и трансляции сопутствуют многим естественным и патологическим состояниям организма, таким, например, как старение, психо-неврологические расстройства, нарушения иммунологического статуса [23, 24]. Возможность коррекции этих изменений представляет существенный интерес для современной биологии и медицины.

THE INFLUENCE OF BRYONIA ALBA EXTRACT ON PROTEIN KINASE ACTIVITY AND THE SYNTHESIS OF RAT BRAIN AND LIVER PROTEINS

APRIKIAN A. G., KOCHARIAN N. V.

H. Kh. Buntiatian Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci., of Rep. Armenia, Yerevan

The influence of Bryonia alba extract on protein kinase activity and the synthesis of rat brain and liver proteins are studied in vivo and in vitro. It is shown the stimulating effect of the extract on the activity of as cAMP-dependent as well as cAMP-independent PK which, probably, underlines the participation of different secondary messengers in this process.

It is defined that the extract essentially increases the corporation of ^{35}S metionin in trichlor acetic acid—non soluble fraction of the rat brain. On electrophoregramme of the subcellular fraction of the rat liver, treated by the extract, are discovered certain changes of protein spectrum. The nuclear fraction is characterized by some decrease, and the microsomal fractions are characterised by some increase of expression level of some proteins.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Амирдовлат Амасиаци. — В кн.: Ненужное для неучей, с. 531—539, Москва, Изд-во АН СССР, 1990.
2. Варданян С. А. — В кн.: Попытки лечения опухолей в средневековой армянской медицине, с. 48—57, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1976.
3. Абу Али Ибн Сина. — В кн.: Канон врачебной науки, кн. 2, с. 619—621, Ташкент, Изд-во ФАН, 1982.
4. Panossian A. G., Avelissian G. M., Mnatsakanian V. A., Batrakov S. G., Vartanian S. A., Gabrielian E. S., Amroyan E. A. *Planta med.*, v. 47, p. 17—25, 1983.
5. Априкян Г. В., Кнарян В. Л., Гекчян К. Г. — В сб.: Тезисы X Всесоюз. конф. по эволюционной физиологии, посвященной памяти академика Л. А. Орбели, с. 69—70, Ленинград, 1990.
6. Априкян А. Г., Коcharян Н. В. — Журнал эксп. клин. медицины, т. 32 (в печати).
Kuo J. F., Greengard P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 76, p. 5096—5096, 1979.
7. Constantinou A. I., Squinto S. P., Jungmann R. A. *Cell*, v. 42, p. 429—437, 1985.
8. Nesterova M. V., Severin E. S. *Life Chem. Rep.*, v. 4, p. 391—465, 1987.
9. Aprikian A. G., Nesterova M. V., Severin E. S. *Biochem. Intern.*, v. 16, p. 601—607, 1988.
10. Iynedjian P. B., Hanson R. W. *J. Biol. Chem.*, v. 252, p. 655—662, 1977.
11. Ruiz-Bravo N., Ernest M. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 79, p. 365—368, 1988.
12. Firestone G. L., Heath E. C. *J. Biol. Chem.*, v. 256, p. 1396—1403, 1981.
13. McMorris F. A., Smith T. M., Sprinkle T. G., Auszmann J. M. *J. Neurochem.*, v. 44, p. 1242—1251, 1985.
14. Porcellati G., Arienti G., Pirota M. G., Giorgini D. *J. Neurochem.*, v. 18, p. 1395—1417, 1971.
15. Laemmli U. K. *Nature*, v. 227, p. 680—685, 1970.
16. Нестерова М. В., Глухов А. И., Априкян А. Г., Северин Е. С. *Биохимия*, т. 52, с. 1150—1153, 1987.

18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
19. Konopa J., Matuszkiewicz A., Hrabowska M., Onoszka K. *Arzneimittel-Forsch.*, J. 24, s. 1741—1743, 1-74.
20. Anderson N. G., Maller J. L., Touks N. K., Sturg T. W. *Nature*, v. 343, p. 651—652, 1990.
21. Nesterova M. V., Glukhov A. I., Severin E. S. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 49, p. 53—59, 1982.
22. Boney C., Fink D., Schlichter D., Carr K., Wicks W. D. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 4911—4918, 1983.
23. Cristofalo V. J., Doggett D. L., Brooks-Frederich K. M., Philips P. D. *Exp. Gerontology*, v. 54, p. 367—376, 1989.
24. Dexter D. T., Garayon A., Vidailhet M., Ruberg M., Agid F., Agid Y., Lees A. J., Wells F. R., Jenner P., Mardsen C. D. *J. Neurochem.*, v. 55, p. 122—129, 1990.

Поступила 7, V, 1992.

УДК 577.112/115/036/15.042

УЧАСТИЕ БЕЛКОВЫХ И ЛИПИДНЫХ КОМПОНЕНТОВ
МЕМБРАН ХРОМАФФИННЫХ ГРАНУЛ В РЕАКЦИЯХ,
КАТАЛИЗИРУЕМЫХ ДОФАМИН- β -МОНООКСИГЕНАЗОЙ

ПЕТРОСЯН С. Ам., БОЯДЖЯН А. С., КАРАГЕЗЯН К. Г.

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван

Исследованы донорно-акцепторные отношения цитохрома b_{561} , кислого медьсодержащего белка и дофамин- β -монооксигеназы из мембран хромаффинных гранул. Используя методы оптической спектроскопии и полярографии, показано, что кислый медьсодержащий белок может служить донором электронов в реакциях гидрокселирования, катализируемых дофамин- β -монооксигеназой, и одновременно акцептором электронов цитохрома b_{561} . Установлено также, что реакции переноса электронов между отмеченными белками модулируются некоторыми липидами—аналогами фосфолипидных компонентов мембран хромаффинных гранул. На основании полученных данных сделан вывод о наличии *in vivo* функциональной взаимосвязи между цитохромом b_{561} , кислым медьсодержащим белком и дофамин- β -монооксигеназой и о возможном участии фосфолипидных компонентов мембран хромаффинных гранул в процессах переноса электронов между этими белками.

Хромаффинные гранулы (ХГ), локализованные в основном в мозговом слое надпочечников, осуществляют хранение, накопление и секрецию гормонов катехоламинной природы [1]. В ХГ протекает также один из этапов биосинтеза катехоламинов—гидрокселирование дофамина с образованием норадреналина, катализируемый дофамин- β -монооксигеназой (ДБМ) (КФ 1.14.17.11), для осуществления которого необходимо наличие электронодонорных систем [2, 3]. В гранулах две формы ДБМ—мембранная и растворимая [3]. Если вопрос о природе донора электронов растворимой формы фермента можно считать решенным [3], то физиологический донор электронов мембранной формы фермента до настоящего времени не установлен. В то же время, в мембранах ХГ обнаружен ряд белков, обладающих способностью переносить электроны — NADH: (акцептор) редуктаза, флавопротеид, цитохром b_{561} и кислый медьсодержащий белок (КМБ) [4—7], аналоги которых, как правило, являются компонентами известных цепей переноса электронов митохондриальных и микросомных мембран. Представляется вполне вероятным, что все вышеотмеченные белки могут являться компонентами единой цепи переноса электронов, поставляющей восстановительные эквиваленты конечному акцептору этой цепи ДБМ, осуществляющей реакцию биосинтеза норадреналина. Известно, что сходные системы функционируют на мембранах микросом и мито-

хондрией, осуществляя поставку восстановительных эквивалентов, необходимых в реакциях гидроксирования, катализируемых цитохромом P₄₅₀ [8, 9].

Изучение функциональной взаимосвязи переносчиков электронов мембран ХГ могло бы в значительной степени прояснить вопрос относительно природы физиологического донора электронов ДБМ и возможности существования на мембране ХГ цепи переноса электронов.

В настоящей работе представлены результаты экспериментов по изучению донорно-акцепторных отношений некоторых компонентов предполагаемой цепи (цитохрома b₅₆₁, КМБ и ДБМ) и взаимодействию их с фосфолипидами (ФЛ) и сфингомиелином (СФМ) — аналогами мембранных липидов ХГ. Отдельные этапы данного исследования были описаны в наших предыдущих сообщениях [10—12].

Материалы и методы

ХГ выделяли из мозгового слоя свежих надпочечников быка методом Hoffman и др. [13]. Белковые компоненты мембран ХГ (цитохром b₅₆₁, КМБ и ДБМ) были получены описанными ранее методами [13—16]. Содержание меди в препаратах белков и липосом определяли методом Matsuba, Takahashi [17]. Препараты КМБ, ДБМ и цитохрома b₅₆₁ восстанавливали 10-кратным молярным избытком аскорбата и дитионита соответственно, окисляли 10-кратным молярным избытком феррицианида. Медь из состава КМБ удаляли инкубацией с эквимольным количеством ЭДТА в течение 30 мин, реконструкцию проводили в присутствии 2-кратного молярного избытка CuCl₂ в течение 10 мин. Избыток окислителя, восстановителя, ЭДТА и CuCl₂ удаляли гель-фильтрацией на сефадексе G-25. Все отмеченные процедуры проводили при комнатной температуре. Белок определяли методом Lowry и соавт. [18], в качестве стандарта использовали БСА.

В работе использовали коммерческие препараты фосфатидилэтаноламина (ФЭ) и лизофосфатидилэтаноламина (лФЭ) из сердца быка, фосфатидилхолина (ФХ) и лизофосфатидилхолина (лФХ) из яичного желтка, фосфатидной кислоты (ФК) из яичного ФХ, СФМ из почек свиньи, моно- и дифосфатидилинозитов из семян сои и фосфатидилсерина (ФС) из мозга быка. Перед употреблением все липиды очищали от примесей других липидов, лизо-форм, жирных кислот и продуктов перекисного окисления, как описано ранее [19]. Липидные везикулы со Стоксовым радиусом от 80 до 115 Å получали обработкой ультразвуком суспензии липида в 20 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,0 (20 мг липида в 1 мл буфера) в течение 20 мин при частоте 22 кГц и 10° на диспергаторе УЗДН-2Т трубчатым концентратором под током азота. В этих условиях лизо-формы ФЛ, моно- и дифосфатидилглицериды образуют мицеллы, а все остальные используемые ФЛ и СФМ — бислойные липосомы [20]. Для удаления высокомолекулярных агрегатов смесь центрифугировали 2 ч при 15000g. Индекс Клей-

на (A_{233}/A_{215}) полученных препаратов составлял 0,3—0,5, что находится в пределах допустимых значений [20].

У. А. ДБМ определяли методом Kuzuya, Nagatsu [23]. Инкубационная смесь содержала 20 мМ тирамин (субстрат), 10 мМ донор электронов (КМБ, аскорбат или ферроцианид), 20 мМ фумарат, 2—10 мкг фермента в 10 мМ Na-ацетатном буфере, pH 6,0. В контрольных пробах субстрат добавляли после остановки реакции. Смесь инкубировали при 37° в течение 30 мин, реакцию останавливали добавлением 4N NH_4OH . Смесь центрифугировали и к надосадочной жидкости добавляли периодат Na (2%) для окисления образующегося в ходе реакции окситирамина до оксибензальдегида. Через 5 мин добавляли мета-бисульфит Na (10%) для нейтрализации избытка периодита и регистрировали поглощение оксибензальдегида при 330 нм. У. А. выражали в мкмоль продукта, образующегося за 1 мин/1 мг белка. В качестве стандарта использовали раствор оксибензальдегида. При изучении кинетики образования продуктов реакции гидроксилирования, катализируемой ДБМ, использовали инкубационную смесь, содержащую субстрат донор электронов и фермент. При использовании липидов фермент предварительно инкубировали с препаратами липосом или мицелл при комнатной температуре 10 мин. Смесь инкубировали при 37° 15 мин, через каждые 5 мин отбирали пробы и далее повторяли те же процедуры, что и в случае определения У. А. За кинетикой окисления цитохрома b_{561} следили по уменьшению интенсивности полосы поглощения с максимумом при 561 нм, характерной для восстановленной формы цитохрома и отсутствующей у окисленной.

Оптические измерения проводили на спектрофотометре «СФ—46» и «Спектод М—40» при комнатной температуре, в кюветах с длиной оптического пути 1 и 0,5 см; полярографические — на кислородном анализаторе «Beckman», снабженном электродом Кларка, при 37° в герметичной кювете.

Эксперименты проведены в модельных системах с использованием высокоочищенных препаратов соответствующих белков и везикул, сформированных из отмеченных липидов. Полученные в работе данные являются средними трех независимых экспериментов, каждый из которых включал от трех до пяти измерений.

Результаты и обсуждение:

Эксперименты по изучению донорно-акцепторных отношений цитохрома b_{561} , КМБ и ДБМ показали возможность переноса электронов от цитохрома к КМБ, с одной стороны, и от КМБ к ДБМ—с другой. Так, инкубация восстановленных препаратов цитохрома b_{561} с окисленными препаратами КМБ приводила к восстановлению последнего и окислению цитохрома. На рис. 1, а показана кинетика отмеченного процесса (кривая 3). Окисления цитохрома b_{561} не наблюдалось в присутствии как восстановленных препаратов КМБ, так и его окисленной

апо-формы. Реконструированный белок в окисленном состоянии вновь мог выступать в роли акцептора электронов цитохрома.

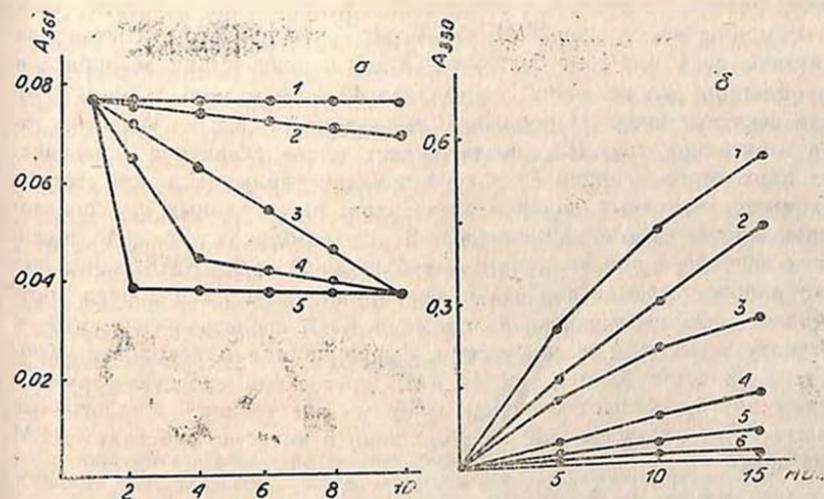


Рис. 1. Окисление восстановленной формы цитохрома b_{561} под действием окисленной формы КМБ в присутствии ФК (1), ФС (2), без липида (3), ФЭ (4) и ЛФЭ (5). Реакционная смесь содержит: $1,5 \times 10^{-6}$ М цитохром, 2×10^{-5} М КМБ и 10^{-3} М соответствующий липид. Регистрировали в 10 мМ К-На-фосфатном буфере, рН 7.0, в 1 см кювете (а); образование окситирамина при гидроксировании тирамина в присутствии ЛФХ (1), ФХ (2), без липида (3), ФЭ (4), ФС (5) и ФК (6). Реакционная смесь содержит: 5×10^{-8} М ДБМ, 10^{-6} М КМБ, 2×10^{-5} М тирамина и 5×10^{-5} М соответствующий липид в 10 мМ Na-ацетатном буфере, рН 6.0. Кинетику регистрировали в 0,5 см кювете (б)

Как было ранее отмечено, реакции, катализируемые ДБМ, протекают лишь в присутствии внешнего донора электронов (фермент представляет собой медьсодержащую гидроксилазу со смешанными функциями). Нами было обнаружено, что в присутствии восстановленных препаратов КМБ фермент оказался способным катализировать реакции гидроксирования соответствующих субстратов — тирамина и дофамина. В присутствии окисленных препаратов КМБ либо его восстановленных апо-форм образования продуктов реакции гидроксирования не наблюдалось. Реконструированные препараты КМБ вновь приобретали способность выступать в роли доноров электрона ДБМ. На рис. 2 представлена кинетика образования продуктов (а) и поглощения кислорода (б) в ходе реакции гидроксирования тирамина под действием ДБМ в присутствии КМБ, а также двух других наиболее эффективных *in vitro* доноров электронов фермента — ферроцианида и аскорбата [24]. Отметим, что хотя последний является общепризнанным физиологическим донором электронов растворимой ДБМ [3], и его концентрация в ХГ достаточно велика [25], установлено, что *in vivo* мембранная форма фермента не способна использовать этот

восстановитель в качестве донора электронов [26]. Как следует из представленных на рис. 2 данных, реакция, катализируемая ДБМ, наиболее интенсивно протекает при наличии в инкубационной среде в качестве донора электронов КМБ. У. А. фермента при этом составляла 56 мкмоль за 1 мин/1 мг белка, тогда как в присутствии аскорбата и феррицианида эта величина составляла 43 и 29 мкмоль /1 мин/ 1 мг белка соответственно. Наибольшую эффективность КМБ в качестве донора электронов для ДБМ подтверждает также сравнение кинетических параметров реакции гидрокселирования тирамина в присутствии трех вышеотмеченных доноров электронов, рассчитанных с использованием преобразований Лайнунвера-Берка (таблица). Так, V поглощения кислорода при наличии в инкубационной среде КМБ, выше, нежели в присутствии аскорбата и феррицианида, в 1,5 и 2 раза соответственно. Одновременно в присутствии КМБ сродство фермента к субстрату выше, чем в присутствии феррицианида и аскорбата. Кроме того, сродство ДБМ к самому КМБ превосходит сродство фермента к двум другим вышеотмеченным донорам электронов. Аналогичные данные были получены при использовании в качестве субстрата ДБМ дофамина.

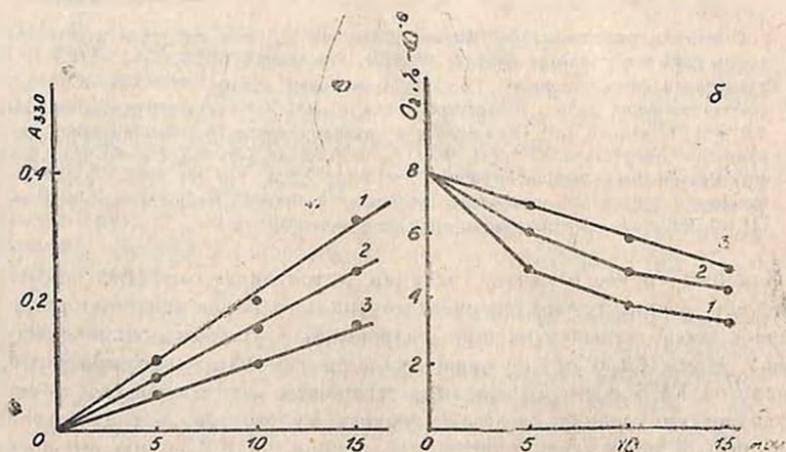


Рис. 2. Окисление восстановленной формы цитохрома b_{561} под действием окисленной формы КМБ (а) и спектры оптического поглощения восстановленной и окисленной форм цитохрома (б). Реакционная смесь содержит: 4×10^{-6} М цитохром и $2,4 \times 10^{-4}$ М КМБ. Кинетику регистрировали в 10 мМ К-Na-фосфатном буфере, рН 7,0, при комнатной температуре в 1 см кювете.

Таким образом, результаты по изучению донорно-акцепторных отношений цитохрома b_{561} , КМБ и ДБМ позволяют с достаточной степенью вероятности предполагать, что один из участков цепи переноса электронов мембран ХГ включает в себя отмеченную функциональную последовательность из этих трех компонентов. Ранее со стороны ряда авторов в экспериментах на фрагментах мембран и телях ХГ было

показано, что восстановление цитохрома b_{561} приводит в конечном итоге к стимуляции реакции гидроксирования, катализируемой ДБМ [27]. Однако ни в системах *in vivo*, ни *in vitro* не удалось показать наличие прямого переноса электронов от цитохрома b_{561} к ДБМ. Разность окислительно-восстановительных потенциалов цитохрома b_{561} и ДБМ (140 и 350 мВ) [6, 24] позволяет предполагать наличие между ними промежуточного звена. Как показали проведенные нами исследования, роль промежуточного звена, функционирующего на участке переноса электронов от цитохрома b_{561} к ДБМ, способен выполнять КМБ, являясь при этом фактически непосредственным донором электронов фермента. Поскольку, как было ранее отмечено, апо-форма фермента не оказалась способной ни принимать электроны от цитохрома b_{561} , ни передавать их ДБМ, мы пришли к выводу, что окислительно-восстановительные свойства КМБ обусловлены наличием в его молекуле атома меди (1 атом меди на молекулярную массу 10 кДа) [7].

Таблица

Кинетические параметры реакции гидроксирования тирамина в присутствии кислого медьсодержащего белка, аскорбата и ферроцианида, определенные при изучении зависимости начальной скорости поглощения O_2 от концентрации донора электронов (А) и субстрата (В).

Донор электронов	А		Б	
	K_m донора 10^{-4}	V поглощения O_2 10^{-5} М/мин	K_m тирамина 10^{-4} М	V поглощения O_2 10^{-5} М/мин
Кислый медьсодержащий белок	4,0	5,0	1,3	2,9
Аскорбат	5,0	3,3	2,1	2,0
Ферроцианид	6,3	2,2	3,7	1,5

В следующей серии наших экспериментов было изучено воздействие ряда фосфолипидов (лФХ, ФХ, лФЭ, ФЭ, моно- и дифосфатидилинозитов, ФК, ФС и СФМ) — аналогов мембранных липидов ХГ — на реакции переноса электронов между цитохромом b_{561} , КМБ и ДБМ. Эти исследования представляют, на наш взгляд, определенный интерес, поскольку все три вышеотмеченных белка входят в состав мембран ХГ и, соответственно, находятся в определенном липидном микроокружении.

Как показали проведенные эксперименты, нейтральные ФЛ активировали процесс переноса электронов, в то время как кислые ФЛ ингибировали его. Так, перенос электронов от цитохрома b_{561} к КМБ активировался в присутствии ФЭ и лФЭ, а от КМБ к ДБМ — в присутствии ФХ и лФХ. С другой стороны, ФК и ФС ингибировали процесс переноса электронов на обоих этапах. Остальные из используемых липидов не оказывали существенного воздействия на отмеченные реакции переноса электронов. На рис. 1, а показано воздействие ФЭ.

лФЭ, ФК и ФС на реакцию переноса электронов от цитохрома b_{561} к КМБ, а на рис. 1, б — воздействие ФХ, лФХ, ФЭ, ФС и ФК на реакцию гидроксидирования тирамина, катализируемую ДБМ, в присутствии КМБ в качестве донора электронов. Следует отметить, что аналогичные данные были ранее получены нами при использовании в качестве доноров электронов аскорбата и ферроцианида для двух субстратов ДБМ — тирамина и дофаминна [19]. Более высокая степень активации реакций переноса электронов в присутствии лизоформ ФЛ — лФЭ и лФХ, по сравнению с ФЭ и ФХ соответственно, (рис. 1) является, на наш взгляд, следствием того, что при одной и той же исходной концентрации липида в смеси, в случае мицеллярных везикул, образуемых лизо-формами липидов, количество молекул, способных к взаимодействию, больше, чем в случае бислойных липосом, образуемых ФЭ и ФХ. Нам удалось в определенной степени прояснить механизм ингибирующего действия кислых ФЛ на обоих этапах переноса электронов. При гель-фильтрации на колонке с сефарозой 6В смеси, содержащей ДБМ или КМБ и липосомы, сформированные из ФС и ФК, медь, входящая в состав активных центров этих белков, обнаруживалась во фракции липосом. С другой стороны, при наличии в инкубационной смеси экзогенной меди, ингибирующего воздействия ФК и ФС не обнаруживалось. Мы предполагаем, что медь связывается с отрицательно заряженными головками соответствующих кислых ФЛ. В этой связи становится понятной более высокая степень ингибирования реакций переноса электронов со стороны ФК по сравнению с ФС (рис. 1), так как суммарный отрицательный заряд первой больше, чем у последнего.

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют, что некоторые ФЛ, входящие в состав мембран ХГ, способны модулировать реакции переноса электронов между цитохромом b_{561} , КМБ и ДБМ. Интересно отметить, что некоторые из отмеченных ФЛ-модуляторов тесно связаны с изучаемыми нами белками, составляя *in vivo* их непосредственное липидное микроокружение. Так, ФЭ является составным компонентом липидного микроокружения цитохрома b_{561} [14], а ФХ и ФС — ДБМ [28]. К сожалению, пока еще ничего не известно о липидном микроокружении КМБ.

Таким образом, сопоставляя приведенные факты с полученными нами данными, можно допустить возможность участия липидного микроокружения цитохрома b_{561} и ДБМ в реакциях переноса электронов, осуществляемых этими белками при наличии КМБ в качестве промежуточного звена. Выполняют ли фосфолипиды регуляторную роль, осуществление которой возможно как в случае их взаимопревращения (ФС ↔ ФЭ ↔ ФХ), так и взаимозамещения (латеральная диффузия или флип-флоп), или же липидное окружение отмеченных белков всегда постоянно и создает в комплексе ту среду, которая обеспечивает им наиболее эффективное функционирование — эти вопросы требуют своего дальнейшего решения.

THE PARTICIPATION OF THE PROTEIN AND LIPID COMPONENTS OF THE CHROMAFFIN GRANULE MEMBRANE IN THE REACTIONS CATALYZED BY DOPAMINE- β -MONOOXYGENASE

PETROSYAN S. H., BOYAJIAN A. S., KARAGEUZYAN K. G.

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

Donor-acceptor relationships between cytochrome b_{561} , dopamine- β -monooxygenase and acidic copper containing protein have been investigated. By the use of optical spectroscopy and polarography it was shown that acidic copper containing protein appears to be the electron donor in the hydroxylation reactions catalyzed by dopamine- β -monooxygenase as well as the electron acceptor for cytochrome b_{561} . It was also determined that the electron transfer reactions between the above mentioned proteins are modulated by some lipids—the analogs of the chromaffin granule membrane phospholipids. On the base of data obtained the possible participation of the chromaffin granule membrane phospholipids in the electron transfer between these proteins has been concluded.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Winkler H., Westhead H. *Neuroscience*, v. 51, p. 1803—1817, 1980.
2. Stewart L. C., Klinman J. P. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 57, p. 551—592, 1988.
3. Winkler H., Apps D. K., Fischer-Colbrie R. *Neuroscience*, v. 18, p. 261—290, 1986.
4. Zaremba S., Hoque-Angeletti R. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 219, p. 297—305, 1982.
5. Петросян С. А., Бояджян А. С., Карагеузян К. Г., Аликян С. А., Абрамов Р. Е. *Нейрохимия*, т. 11, № 1, с. 29—40, 1992.
6. Flatmark T., Terland O. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 253, p. 487—491, 1971.
7. Mikaelyan M. V., Grigoryan N. A., Na'bandyan R. M. *Abstracts 12th Int. Congr. Biochem.*, Australia, p. 326, 1982.
8. Ohashi M., and Omura T. *J. Biol. Chem.*, v. 253, p. 4653—4658, 1978.
9. Georgiou M., Perkins L. M., Payne A. N. *Endocrinology*, v. 121, p. 1390—1399, 1987.
10. Бояджян А. С. *Биохимия*, т. 50, с. 84—89, 1985.
11. Осанесян Л. Л., Бояджян А. С., Петросян С. А., Карагеузян К. Г. *Докл. АН СССР*, т. 317, стр. 742—745, 1991.
12. Petrosyan S. A., Novanesyan L. L., Boyajian A. S., Karageuzyan K. G. *Abstracts of 8th General Meeting of European society for Neurochemistry*, GDR, Leipzig, p. 98, 1990.
13. Hoffman P. G., Zinder O., Eonner W. M., Pollard H. B. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 176, p. 375—383, 1976.
14. Петросян С. А., Бояджян А. С., Карагеузян К. Г. *Укр. биохим. журн.*, т. 63, с. 39—45, 1991.
15. Григорян Н. А. Новые металлсодержащие белки хромоаффинных гранул. Очистка и физико-химические свойства. Дис. канд. биол. наук.—134 с., Ереван, Институт биохимии, 1983.
16. Бояджян А. С., Налбандян Р. М., Бунятыан Г. Х. *Биохимия*, т. 46, с. 635—641, 1981.
17. Matsuba Y., Takahashi Y. *Anal. Biochem.*, v. 36, p. 182—191, 1970.

18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. I., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
19. Boyadzhyan A. S., Karageuzyan K. G. *Biomed. Science*, v. 1, p. 379—383, 1990
20. Левчук Ю. Н., Воловик Э. Н. *Биофизика*, т. 28, с. 266—269, 1983.
21. Миргород Л. Б., Бергельсон Л. Д. *Липосомы и их взаимодействие с клетками*. М., Наука, 1986.
22. Klein R. A. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 210, p. 486—489, 1970.
23. Kuzuya H., Nagatsu T. *Enzymologia*, v. 38, p. 31—38, 1969.
24. Ljones T., Skotland T. *Inorg. Persp. Biol. Medic.*, v. 2, p. 151—180, 1979.
25. Terland O., Falmark T. *FEBS Lett.* v. 59, p. 52—56, 1975.
26. Grousselle M., Phillips J. H. *Biochem. J.*, v. 202, p. 759—770, 1982.
27. Wakefield L. M., Cass A. E. G., Radda G. K. *J. Biol. Chem.*, v. 261, № 21, p. 9739—9745, 1986.
28. Saxena A., Fleming P. J. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 4147—4152, 1983.

Поступила 28. IX, 1992

УДК 612.82:577.95:577.112:577:335

ИЗМЕНЕНИЕ ФОСФОЛИПИДНОГО СОСТАВА
ПРОТЕОЛИПИДОВ МИЕЛИНА МОЗГА КРЫСЫ В ХОДЕ
МИЕЛИНОГЕНЕЗА

СТЕПАНЯН А. А., МАНУКЯН К. Г.

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

Показано, что концентрация неочищенных и очищенных протеолипидов (ПЛ) и связанных с ними свободных фосфолипидов (ФЛ) — (РХ25 в мг/г) влажной массы мозга в миелине мозга крысы постепенно повышается с возрастом. Уже на ранних стадиях образования миелина (10-дневные крысы) в составе его ПЛ имеются все те ФЛ, которые обнаруживаются в миелине мозга взрослых животных. Однако фосфолипидный состав ПЛ миелина претерпевает определенные изменения в ходе миелиногенеза. По мере развития в неочищенных и особенно очищенных ПЛ миелина уменьшается содержание нейтральных ФЛ, главным образом фосфатидилхолина, и резко возрастает содержание кислых ФЛ, особенно фосфатидилсерина. Одновременно увеличивается процент кислых ФЛ — фосфатидилсерина, дифосфатидилглицерина и фосфатидилинозита, более прочно связанных с белком ПЛ. Эти сдвиги имеют место в основном в период наиболее активного накопления миелина — между 17-ым и 30-ым днями после рождения и связаны, по-видимому, с изменением белкового состава миелиновых ПЛ. Известно, что в это время в миелине, наряду с белком ДМ-20, преобладающим на ранних стадиях развития резко возрастает содержание главного белка ПЛ.

ПЛ представляют довольно широко распространенную группу типично внутренних, гидрофобных мембранных белков, связанных с липидами и объединенных на основе специфической растворимости в органических растворителях [1, 2]. Они являются необходимыми компонентами мембран животных, растительных и микробных клеток [2—4]. ПЛ особенно богата нервная ткань и главным образом белое вещество мозга, где они локализованы в основном в миелине, составляя 30—50% общего белка миелина, выделенного из головного мозга млекопитающих [2, 5—7]. Полагают, что эти белки и связанные с ними липиды принимают активное участие в формировании и поддержании уникальной мультисамеллярной структуры миелина [2, 8, 9]. Одновременно миелиновый ПЛ, благодаря своей конформационной гибкости и способности агрегировать, может модулировать жидкость липидного окружения в мембране и таким образом влиять на активность ферментов миелиновой оболочки [2]. Накапливается все больше фактов, свидетельствующих о важной роли ПЛ в развитии патологических процессов в НС, в этиологии и патогенезе демиелинизирующих заболеваний генетического, аллергического и вирусного происхо-

ждения [9, 10]. Показано, что одной из основных причин возникновения наследственных демиелинизирующих заболеваний является нарушение биосинтеза апотротенина ПЛ миеллина, либо его встраивания в миелиновую мембрану [11, 12]. В последние годы уделяется большое внимание вопросам, связанным с синтезом миелиновых ПЛ, их посттрансляционной модификацией, доставкой и встраиванием в миелиновую мембрану [13]. Показано, что миелиновые ПЛ синтезируются на шероховатом эндоплазматическом ретикулуме и без или посттрансляционной модификации транспортируются к миелиновому комплексу, проходя транзитом через девять промежуточных мембранных пулов [14].

В связи с вышесказанным представляет интерес изучение формирования протеолипидных комплексов миеллина в ходе онтогенеза. Имеющиеся в литературе по этому вопросу данные касаются только белкового компонента ПЛ, липидный компонент не изучали. Между тем, как отмечалось, связанные с белком ПЛ липиды играют, по-видимому, важную роль в процессе формирования миеллина и поддержания его структуры. Поскольку, как было показано ранее [15], с ПЛ белого вещества и миеллина, как и других субклеточных образований мозга, связаны в основном ФЛ, задачей настоящего исследования явилось изучить фосфолипидный состав ПЛ, выделенных в виде очищенных в разной степени от липидов липидно-белковых комплексов из миеллина мозга крыс разного возраста.

Сроки исследований были выбраны в соответствии с данными литературы о ходе миелинизации в мозгу крысы.

Материалы и методы

Исследования проводили на 10-, 13-, 15-, 17-, 20- и 30-дневных белых крысах. Животных декапитировали и извлекали головной мозг. Миеллин изолировали методом [16]. Липидные экстракты, содержащие ПЛ, получали и отмывали по методу [17]. ПЛ выделяли из промытых липидных экстрактов миеллина методом эмульгирования—центрифугирования [18] с той разницей, что опускали последнее центрифугирование при 200g. Лиофилизированные осадки полученных этим методом неочищенных протеолипидов (НПЛ) промывали для удаления менее прочно связанных липидов 2 раза 600-кратным объемом смеси спирт-эфир (1:1) при -6° . Применяли абсолютный спирт и обезвоженный эфир. Полученные в результате ПЛ обозначали как «очищенные» протеолипиды (ОПЛ). Расщепление связей между липидами и белками, экстракцию и отмывку липидного компонента, хроматографическое разделение ФЛ производили методами, описанными ранее [18, 19].

Результаты и обсуждение

Концентрация НПЛ и ОПЛ и связанных с ними общих ФЛ ($P \times 25$) в мг/г влажной массы мозга постепенно повышалась в миели-

не мозга крысы в процессе развития, особенно начиная с 17 дня после рождения (табл. 1). Однако процентное содержание ФЛ в НПЛ и полученных после их промывания ОПЛ поддерживалось на довольно постоянном уровне на протяжении всего изученного периода миелиногенеза.

Таблица 1
Содержание НПЛ и ОПЛ и связанных с ними общих ФЛ
в миелине мозга крыс разного возраста

Возраст (дни)	Н П Л			О П Л		
	мг г вл. массы	фосфолипиды		мг г вл. массы	фосфолипиды	
		мг г вл. массы	% от мас- сы НПЛ		мг г вл. массы	% от мас- сы ОПЛ
10 (1)*	0,197	0,064	32,69	0,080	0,011	13,72
13 (2)	0,172	0,054	31,63	0,075	0,007	9,63
15 (2)	0,252	0,062	24,80	0,058	0,008	14,70
17 (1)	0,493	0,179	36,02	0,172	0,033	19,48
20 (2)	0,351	0,131	37,30	0,245	0,035	14,47
30 (3)	1,589	0,472	29,72	0,551	0,076	13,81

* Число опытов

При исследовании фосфолипидного состава ПЛ оказалось, что на хроматограммах спирт-эфирных отмывов НПЛ и липидных экстрактов ОПЛ, изолированных из миеллина мозга 10-дневных крыс, выявлялись те же пятна ФЛ, что и у взрослых животных. Однако в ходе постнатального развития состав ФЛ, связанных с НПЛ и ОПЛ, подвергался определенным изменениям.

В табл. 2, 3 содержание каждого ФЛ, связанного с ПЛ, представлено в процентах от общей суммы связанных с ним ФЛ.

Исследования показали, что на всех изученных стадиях развития преобладающими ФЛ НПЛ миеллина являются нейтральные ФЛ и, главным образом, фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭА) (табл. 2). Содержание первого в НПЛ в процессе развития несколько снижалось (в 1,3 раза), а второго, наоборот, возрастало. По мере развития в ФЛ НПЛ миеллина уменьшалось также содержание фосфатидилинозита (ФИ) (в 1,9 раза) и повышалось содержание фосфатидилсерина (ФС) (в 1,54 раза) и особенно фосфатидной кислоты (в 4,0 раза) и сфингомиелина (СФМ) (в 2,52 раза). Основные сдвиги в концентрации большинства ФЛ приходились на период начиная с 17 до 30 дня после рождения, только содержание СФМ повышалось раньше.

В табл. 3 представлен фосфолипидный состав ОПЛ, полученных после промывания НПЛ спирт-эфирной смесью. Из табл. видно, что «очистка» ПЛ из мозга крыс разного возраста приводила к концентрации кислых ФЛ, доля которых в общих ФЛ, связанных с ОПЛ, была значительно выше, чем в НПЛ, уже на ранних стадиях разви-

Таблица 2

Содержание отдельных ФЛ, связанных с НПЛ миелина из мозга крыс разного возраста (в % от суммы ФЛ)

Фосфолипиды	Возраст (дни)					
	10 (1)*	13 (2)	15 (2)	17 (1)	20 (2)	30 (3)
1. Линия старта	4,89	2,71	4,56	2,16	3,97	2,81
2. Лизолецитин	3,96	—	—	—	—	—
3. ФЛ, сорбированные на сульфатиде	4,89	3,08	3,84	2,06	3,51	1,32
4. Фосфатидилинозит	6,56	6,16	5,00	4,91	5,59	3,45
5. Сфингомиелин	4,08	4,50	7,56	9,28	9,38	10,27
6. Фосфатидилхолин	46,47	51,98	48,08	44,37	38,40	40,16
7. Фосфатидилсерин	8,27	10,01	10,68	7,81	13,08	13,00
8. Фосфатидилэтаноламин	20,89	17,60	18,04	28,45	26,03	24,10
9. Дифосфатидилглицерин	—	3,31	2,52	0,28	—	2,35
10. Фосфатидная кислота	—	0,64	0,52	0,61	—	2,54
Кислые ФЛ (3+4+7+9+10)	23,68	23,20	21,76	16,14	22,18	22,66
Нейтральные (5+6+8)	71,43	74,06	73,69	82,20	73,85	74,53
Сумма ФЛ (мкг Рг влажной массы)	2,58	2,12	2,50	7,18	5,24	18,89

* Число опытов

Таблица 3

Содержание отдельных ФЛ, связанных с ОПЛ миелина из мозга крыс разного возраста (в % от суммы ФЛ)

Фосфолипиды	Возраст (дни)					
	10 (1)*	13 (2)	15 (2)	17 (1)	20 (2)	30 (3)
1. Линия старта	4,33	5,51	5,57	1,19	3,17	5,16
2. Лизолецитин	—	—	—	—	—	—
3. ФЛ, сорбированные на сульфатиде	12,30	6,57	8,80	6,65	7,62	5,03
4. Фосфатидилинозит	14,58	12,46	16,12	17,76	12,34	12,26
5. Сфингомиелин	2,96	5,54	—	1,12	7,19	—
6. Фосфатидилхолин	29,84	28,03	24,93	25,75	17,28	8,71
7. Фосфатидилсерин	15,04	26,65	30,50	33,28	43,37	50,90
8. Фосфатидилэтаноламин	20,96	10,38	7,92	9,55	9,03	4,50
9. Дифосфатидилглицерин	—	4,84	5,87	1,42	—	10,61
10. Фосфатидная кислота	—	—	—	3,28	—	2,83
Кислые ФЛ (3+4+7+9+10)	41,92	50,52	61,29	62,39	63,33	81,63
Нейтральные ФЛ (5+6+8)	53,76	43,95	32,85	36,42	33,50	13,21
Сумма ФЛ (мкг Рг влажной массы)	0,44	0,29	0,34	1,34	1,42	3,04

* Число опытов

тия и повышалась с возрастом. Преобладающими ФЛ ОПЛ миелина мозга 10-дневных крыс являлись ФХ, составляющие 30% от суммы всех связанных ФЛ, затем ФЭА — 21%, ФС и ФИ — около 15%. Содержание нейтральных ФЛ: ФХ и ФЭА в ФЛ ОПЛ резко снижалось

по мере развития (в 3,5 и более раз), концентрация же кислых ФЛ главным образом ФС, наоборот, резко возрастала (в 3,3 раза), причем основные изменения приходились на вторую декаду постнатальной жизни, когда начинался и активно протекал процесс миелинизации. С возрастом в ФЛ, связанных с ПЛ, повышалось также содержание дифосфатидилглицерина (ДФГ) — почти в 2,0 раза. Однако содержание другого важного кислого ФЛ — ФИ не изменялось или даже несколько понижалось после 17-дневного возраста (табл. 3).

Соотношение кислые—нейтральные ФЛ в ОПЛ заметно повышалось в ходе развития, тогда как в НПЛ оно почти не претерпевало изменений. У 10-дневных крыс кислые и нейтральные ФЛ составляли 23,7% и 71,4% соответственно от суммы всех ФЛ, связанных с НПЛ и 41,9% и 53,8% соответственно от суммы ФЛ, связанных с ОПЛ. У 30-дневных крыс на долю кислых ФЛ приходилось 82% от суммы всех связанных с ОПЛ ФЛ, а нейтральных—всего 13% (табл. 3).

С возрастом изменялась также прочность связывания ФЛ с белком ПЛ. Мы обозначили как «менее прочно» связанный—ту часть каждого ФЛ, которая экстрагировалась из НПЛ при промывании спирт-эфирной смесью, и как «более прочно» связанный ФЛ—вторую часть, которая оставалась в составе ОПЛ после промывания. Исследования показали, что по мере развития повышается процент кислых ФЛ, более прочно связанных с белком ПЛ. У 10—13-дневных крыс промывание спирт-эфирной смесью приводило к удалению 64—71% всех связанных с ПЛ кислых ФЛ, тогда как у 17—20-дневных крыс в тех же условиях удалялось всего 23—28% кислых ФЛ, а остальные 70% и более оставались в составе ОПЛ (рис. 1). Наибольшие изменения претерпевала прочность связывания с белком ПЛ ФС и ДФГ и, в несколько меньшей степени, ФИ. Этот сдвиг имел место в основном на 17—20 дни после рождения. У 10-дневных крыс с белком ПЛ было связано 31% всего ФС, а у 20-дневных—90% (рис. 2). Сходные данные были получены нами ранее для ПЛ целого мозга крысы [20].

Найденные изменения связаны, по-видимому, с одной стороны, с временем и местом синтеза отдельных ФЛ в мозгу в ходе миелинизации и их комбинации с белком ПЛ. С другой — с изменениями в структуре или составе самих ПЛ, способствующими более прочному связыванию кислых ФЛ с белком ПЛ. Последнее предположение подтверждается данными литературы, согласно которым белковый состав ПЛ миелина претерпевает существенные сдвиги в ходе миелинизации [21]. Известно, что в состав миелина входят в основном два белка протеолипидной природы: белок ПЛ (M_r 30 кД) и белок ДМ—20 (M_r 25 кД). Последний является изоформой белка ПЛ и отличается от него генетически обусловленным выпадением определенной внутренней аминокислотной последовательности. Отсутствующий у белка ДМ—20 фрагмент, состоящий из 35 аминокислот (116—150), соответствует главному гидрофильному домену белка ПЛ, содержащему пять положительно и два отрицательно заряженных аминокислотных

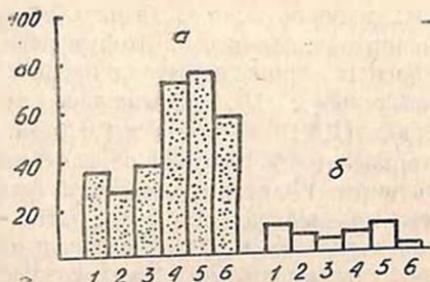


Рис. 1. Изменение содержания более прочно связанной с белком ПЛ миелина части кислых (а) и нейтральных (б) ФЛ в ходе миелиногенеза (в% от всех связанных с ПЛ ФЛ данной группы). 1—10-дневные; 2—13-дневные; 3—15-дневные; 4—17-дневные; 5—20-дневные; 6—30-дневные крысы.

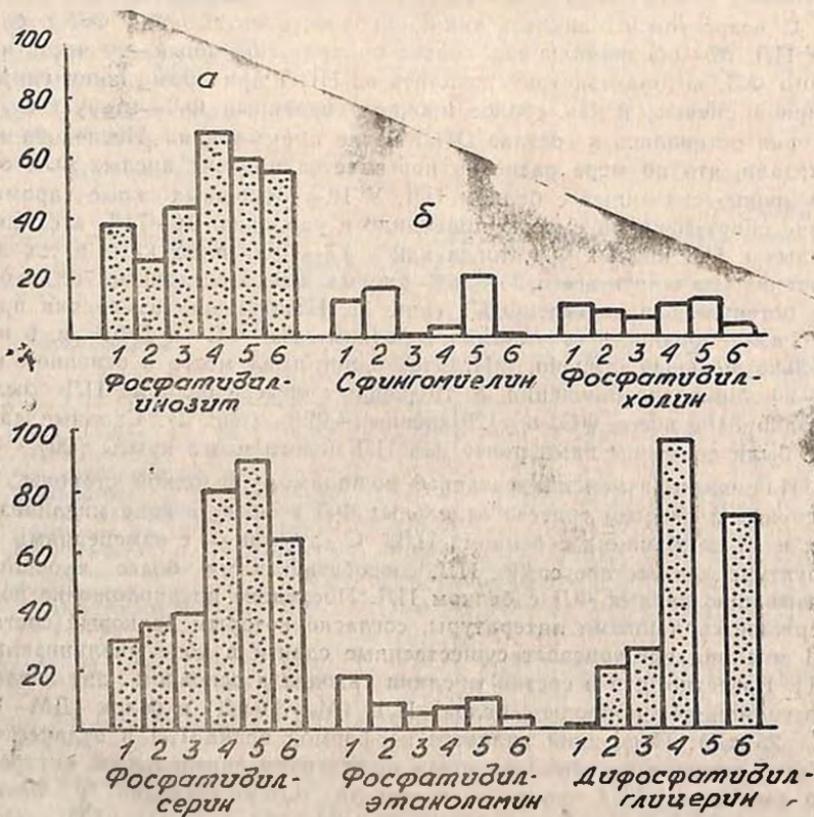


Рис. 2. Изменение содержания более прочно связанной с белком ПЛ миелина части отдельных ФЛ в ходе миелиногенеза (в% от всего связанного с ПЛ ФЛ). 1—10-дневные; 2—13-дневные; 3—15-дневные; 4—17-дневные; 5—20-дневные; 6—30-дневные крысы. а—кислые ФЛ; б—нейтральные ФЛ

остатка [22, 23]. Исследования с применением различных физико-химических методов (ЭСР, флуоресцентный анализ) показали, что хотя оба протеолипидных белка взаимодействуют с ФЛ, только ПЛ обнаруживает строгую специфичность в отношении кислых ФЛ и особенно ФС. Белок ДМ—20, который более гидрофобен, не выявляет такой специфичности и связывается почти одинаково и с кислыми и нейтральными ФЛ [24, 25]. В настоящее время показано, что в развивающемся мозгу белок ДМ—20 появляется значительно раньше, чем белок ПЛ. В начале миелинизации мозг содержит в основном белок ДМ—20, а белок ПЛ нарастает по мере образования миелина, становясь преобладающим у взрослых животных, у которых его содержание в 1,5—1,7 раз выше, чем белка ДМ—20 [21].

Результаты наших исследований относительно изменения фосфолипидного компонента ПЛ в ходе миелиногенеза хорошо коррелируют с этими данными. На ранних стадиях развития (10—15-дневные крысы) ПЛ миелина содержат наряду с кислыми значительные количества нейтральных ФЛ, что можно объяснить преобладанием в этом периоде белка ДМ—20. Увеличение в дальнейшем содержания кислых ФЛ, особенно ФС, в ОПЛ и прочности их связывания с белком можно объяснить накоплением белка ПЛ в период активной миелинизации. Поскольку ПЛ расположены на наружной стороне миелиновой мембраны, а фрагмент 116—150, как полагают, выступает из липидного бислоя, он может через свои положительно заряженные аминокислотные остатки взаимодействовать с отрицательно заряженными липидами противоположного бислоя миелина и этим способствовать формированию компактной мультислойной структуры миелина в ходе миелиногенеза.

Таким образом, обнаруженное нами изменение фосфолипидного состава ПЛ миелина, увеличение количества кислых липидов, более прочно связанных с белком ПЛ, может служить показателем формирования более компактного, упорядоченного миелина в ходе развития.

CHANGES IN COMPOSITION OF PHOSPHOLIPID MOIETY OF RAT BRAIN MYELIN PROTEOLIPIDS DURING MYELINOGENESIS

STEPANIAN A. A., MANUKIAN K. H.

H. Kh. Buntatian Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci.
of Rep. Armenia, Yerevan

It has been shown that the concentration of crude and purified proteolipids (PL) and the total phospholipids (PhL)— $P \times 25$ bound to them increased gradually in rat brain myelin during development. Already at early stages of myelin formation (10-day-old rat) almost all those PhL were found in the composition of phospholipid moiety of PL that were associated with PL in mature brain. But the composition of phospholipid moiety of PL underwent certain changes during myelinoge-

nesis. The contents of neutral PhL, mainly phosphatidylcholine, in crude and especially purified PL of myelin decreased, and the contents of acidic PhL, mainly phosphatidyl serine sharply increased. At the same time noticeably increased the percentage of acidic PhL (phosphatidyl serine, diphosphatidyl glycerol, phosphatidyl inositol) that were more tightly bound to the PL protein. These changes took place chiefly at the period of the most active myelin deposition (17--30 days after birth) and were probably connected with shifts in the composition of protein moiety of PL. It is known that at that time in myelin PL parallel by the protein DM-20, which prevailed at the early stages of myelin formation, sharply the content of the major PL protein increased.

ЛИТЕРАТУРА

1. Folch-Pi J., Lees M. J. *Biol. Chem.*, v. 191, p. 807-817, 1951.
2. Lees M. B., Sakura D. J., Sapirstein V. S., Curatolo W. *Biochim. et biophys. acta*, v. 559, № 2-3, p. 203-230, 1979.
3. Folch-Pi J., Stoffyn P. J., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 195, p. 86-107, 1972.
4. Schlesinger M. J. *Ann. Rev. Biochem.*, v. 50, p. 193-206, 1981.
5. Mehl E., Halaris A. J. *Neurochem.*, v. 17, p. 659-668, 1970.
6. Манукян К. Г., Киракосян Л. Г., Левонян К. Л., Степанян А. А. В сб.: Вопросы биохимии мозга (под ред. Г. Х. Бунятыяна), т. II, с. 116-128, изд-во АН АрмССР, Ереван, 1976.
7. Lees M. B., Macklin W. B. - In: *Neuronal and glial proteins: structure, function and clinical application* (eds. Marangos P. J., Campbell I. C., Cohen R. M.) p. 267-294, Academic Press, San Diego, 1988.
8. Stoffel W., Hillen H., Schroeder W., Deutzmann R., Hoppe-Seyler Z. *Physiol. Chem.*, v. 364, p. 145-146, 1983.
9. Yoshimura T., Kunishita T., Sakai K., Endoh M., Nam'kaw T., Tabira T. *J. Neurol. Sci.*, v. 63, № 1, p. 45-58, 1985.
10. Hafler D. A., Benjamin D. S., Borks J., Weiner H. L. *Immunol.*, v. 139, № 1, p. 68-72, 1987.
11. Campagnoni A. T., Sorg B. J. A., Agrawal D., Agrawal H. C. *J. Neurochem.*, v. 44, suppl., S 23A, 1985.
12. Simons R., Riordan J. J. *Neurochem.*, v. 54, p. 1079-1081, 1990.
13. Bizzozero O. A., Soto E. F., Pasquini J. M. *Neurochem. Int.*, v. 6, p. 659-664, 1984.
14. Konat G., Disakaran P., Samoraiski T., Wiggins R. C. *J. Neurochem.*, v. 44, p. 1500-1510, 1985.
15. Манукян К. Г. *Нейрохимия*, т. I, с. 51-65, 1982.
16. Waehneidt T. V., Matthieu J. M., Neuhoff V. *Brain Res.*, v. 138, p. 29-43, 1977.
17. Folch-Pi J., Lees M., Sloane-Stanley C. H. *J. Biol. Chem.*, v. 226, p. 497-503, 1957.
18. Манукян К. Г., Киракосян Л. Г., Левонян К. Л. - В сб.: *Вопр. биохимии мозга* (под ред. Г. Х. Бунятыяна), т. 7, с. 140-149. Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1972.
19. Смирнов А. А., Чирковская Е. В., Манукян К. Г. *Биохимия*, т. 26, с. 1027-1033, 1961.
20. Manukian K. H., Kirakosian L. G. *Neurochem. Res.*, v. 10, p. 1533-1545, 1985.
21. Schindler P., Luu B., Sorokine O., Trifiliev E., Van Dorsselaer A. J. *Neurochem.*, v. 55, p. 2079-2085, 1990.

22. Trifilieff E., Skalidis G., Helynk G., Lepage P., Sorokine O., Dorssetlaer A., Luu B. C. R. Acad. Sci., Paris, v. 300, S 111, № 7, p. 241—246, 1985.
23. Nave K. A., Lai C., Bloom F. E., Milner R. J. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 84, p. 5665—5669, 1987.
24. Houbre D., Schindler P., Trifilieff E., Luu B., Duportail G. Blochim. et biophys. Acta, v. 1029, № 1, p. 136—142, 1990.
25. Horvath L. I., Brophy P. J., Marsh D. Biochemistry, v. 29, p. 2635—2638, 1990.

Поступила 7. VI. 1992

СТРУКТУРА ДНК И ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ
НЕКОТОРЫХ АНТИАМНЕСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВГАРИБЯН Д. В., ДЖАГАЦЯНЯН И. А., ДАНЦЕЛЯН Н. С., МЕЛИКЯН Г. Г.,
АКОПЯН А. Г., БАБАЯН Ю. С., АВЕТИСЯН М. Г., ГАРИБДЖАНЯН Б. Т.

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

В специализированных отделах мозга обученных животных и животных с ретроградной амнезией исследовано влияние некоторых антиамнестических средств на характер метилирования и вторичную структуру ДНК. Анализ полученных данных показал, что как при выработке условного рефлекса, так и при применении веществ, восстанавливающих ретроградную амнезию, в коре больших полушарий наблюдается заметное увеличение содержания 5-метилцитозина. При этом меняется дифференциальная кривая плавления, в частности уменьшается температура плавления и увеличивается его интервал. Предполагается существование коррективной связи между отмеченными изменениями в уровне метилирования и вторичной структурой, с одной стороны, и функциональной активностью генома, с другой.

В последнее время отмечается повышенный интерес к изучению состояния ДНК в активно функционирующих нервных клетках мозга. Известно, что воздействие нейротропных средств на процесс обучения вызывает перестройку генома, обуславливая, главным образом, метаболические изменения в ДНК клеток головного мозга [1]. Ванюшин и соавт. показали [2], что выработка условного рефлекса сопровождается изменением степени реакции метилирования, о которой судили по содержанию в ДНК минорного основания 5-метилцитозина (5-МЦ).

Целью настоящего исследования было изучение характера метилирования и вторичной структуры ДНК в специализированных структурах мозга при обучении и ретроградной амнезии под влиянием антиамнестического препарата пираретама и соединения АН—346, синтезированного в ИТОХ НАН РА и проявившего антиамнестическую активность.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на белых крысах-самцах массой 130—150 г, разделенных на 4 группы (по 15 крыс в каждой): 1—пассивный контроль (интактные животные, содержащиеся в обычных клетках), 2—активный контроль (животные, прошедшие процедуру обучения), 3—получавшие пираретам, 4—получавшие соединение

АН—346. С целью анализа антиамнестического эффекта вырабатывали условную реакцию пассивного избегания (УРПИ) с последующим применением электрошока в качестве амнестического фактора по модифицированной методике Buges и Bugsova [3]. После 3-минутной регистрации времени пребывания животного в светлом и темном отсеках, в последнем оно подвергалось однократному удару током через электродный пол (обучение). Для получения амнезии использовали максимальный электросудорожный припадок. Проведение электрошока непосредственно после обучения вызывало стирание памятного следа. Тест на воспроизведение осуществляли через 24 ч после обучения, в течение которого контрольные животные забывали обучение и предпочитали находиться в темной части камеры. Критерием антиамнестического эффекта веществ служило предпочтительное нахождение во второй день в светлом отсеке.

3- и 4-й опытным группам животных производили внутривентрикулярное введение субстанции пираретама 200 мг/кг и соединения АН—346 4 мг/кг в виде взвеси с твин—80 и через 45 мин вырабатывали реакцию пассивного избегания с последующим применением электрошока. Сразу после опыта животных деканитировали, из мозжечка и коры больших полушарий по модифицированному методу Мармура [4] выделяли препараты ДНК, содержавшие не более 1,5—2% белка и РНК. Для определения нуклеотидного состава ДНК, включая 5—МЦ, препараты ДНК высушивали при температуре 105° и гидролизовали до оснований (99%-ная муравьиная кислота, 175°, 30 мин). Основания фракционировали с помощью двукратной одномерной восходящей хроматографии на бумаге с последующим спектрофотометрированием [5].

Тепловую денатурацию ДНК проводили в водном растворе, содержащем 0,02 М NaCl, рН 7,3. Кривые плавления получены на спектрофотометре UNICAM SP—8000 при непрерывном режиме нагрева растворов ДНК со скоростью 0,25 град/мин.

Для выяснения особенностей в характере поведения кривых плавления был осуществлен переход дифференциальной кривой плавления (ДКП). ДКП были получены путем численного дифференцирования нормированных кривых плавления по специальной программе [6].

Результаты и обсуждение

Из табл. 1 с данными нахождения животных в светлой камере в течение 3 мин можно видеть, что введение пираретама приводило к удлинению времени воспроизведения рефлекса крыс, то есть к проявлению антиамнестического эффекта. Так, после его применения животные на 2-й день эксперимента пребывали в светлой камере 121,3 с, а после введения АН-346—146,3 с, что в 50,5 и 60,9 раз превосходило соответствующие показатели у животных в активном контроле.

При анализе состава ДНК контрольных животных (пассивный и активный контроль) явно выделяется разница в уровне их метилиро-

вания, причем выработка условного рефлекса сопровождается повышением степени метилирования в обеих изученных структурах мозга, хотя и в мозжечке этот сдвиг оказывается менее выраженным, соответственно на 56,7 и 64,7%. Этот факт свидетельствует об участии генома клеток мозга в формировании условнорефлекторной связи, при этом сам он претерпевает заметные структурные изменения.

Таблица 1

Характеристика параметров мнестических функций мозга на модели электрошоковой амнезии УРПИ после пирacetama и АН-346

Вещества	Время нахождения в светлой камере	
	I-ый день	II-ой день
Контроль пассивный	2,1 (1,8÷2,4)	3,4 (1,0÷5,8)
Контроль активный	2,4 (2,39÷2,4)	2,4 (1,7÷3,1)
Пирacetам	2,7 (2,3÷3,2)	121,3 (72,9÷168,8)*
АН-346	3,1 (2,4÷3,8)	146,3 (108,4÷184,2)*

Примечание. В скобках — доверительные интервалы при $p=0,05$; * $p<0,05$.

ДНК, выделенные из мозга животных, получивших пирacetам и соединение АН-346, имеют разный уровень метилирования. Нуклеотидный состав этих ДНК не отличается от ДНК контрольных животных и соответствует правилам Чаргафа. Изученные препараты принадлежат к АТ типу, количество ГЦ пар оснований (Г+Ц+МЦ) в них составляет 42,9—44,8% и отражает среднее не менее чем из шести определений для каждого препарата ДНК.

Как явствует из табл. 2, под воздействием пирacetama и соединения АН-346 в коре больших полушарий обученных животных отмечается увеличение содержания 5-МЦ по сравнению с контролем на 22 и 94% соответственно.

Таким образом, при применении испытуемых препаратов в коре больших полушарий, связанной с условнорефлекторной деятельностью и формированием памяти происходит индуцируемое увеличение содержания 5-МЦ, а в мозжечке, не обладающем этой функцией, не отмечается статистически достоверных сдвигов содержания 5-МЦ. Судя по имеющимся данным [7, 8], одной из особенностей действия некоторых нейротропных средств, защищающих животных от ретроградной амнезии, вызванной электрошоком, является облегчение у них процессов обучения. Механизм действия этих веществ связывается с активацией деятельности неокортекса, ускорением выработки и повышением устойчивости условных рефлексов. Кроме того, поскольку обнаружено, что при выработке условного рефлекса суперметилированной оказывалась ДНК неокортекса и гиппокампа [2], не исключено, что одним из возможных механизмов дифференциальной регуляции транскрипции

Таблица 2

Нуклеотидный состав и некоторые параметры плавления ДНК

Отдел мозга	Группа животных	Основания в ДНК, мол%						Температура плавления	Интервал плавления
		Г	А	Ц	МЦ ±σ	Т	Г+Ц+ +МЦ		
Мозжечок	контроль пассивный	21,3	28,4	20,9	0,74±0,24	28,1	42,9	—	—
	контроль активный	21,5	28,9	20,4	1,16±0,11	28,0	43,0	—	—
	получивших пирацетам	21,6	28,6	20,5	1,17±0,11	28,2	43,2	—	—
Кора больших полушарий	получивших АН—346	21,9	28,5	21,0	1,00±0,13	28,3	43,9	—	—
	контроль пассив.	21,7	28,7	21,0	1,02±0,19	28,5	42,8	—	—
	контроль актив	21,5	28,7	20,4	1,50±0,11	28,3	43,5	73,1±0,1	6,7±0,1
	получивших пирацетам	21,5	28,2	20,4	1,84±0,12	28,0	43,7	69,5±0,1	7,0±0,2
	получивших АН—346	21,6	28,0	20,4	2,91±0,25	28,0	44,8	67,4±0,2	8,6±0,2

Примечание: достоверность отличия по количеству МЦ от контроля ($p < 0,05$)

является процесс метилирования ДНК с вероятным ускорением синтеза РНК и появлением в клетках мозга новых РНК [9]. Как следует из рисунка и табл. 2, с увеличением содержания 5-МЦ при применении пиррацетама, и особенно соединения АН-346, имеет место уменьшение температуры плавления и увеличение его интервала. В низкотемпературной области (53—63°) на ДКП указанных ДНК отмечается появление пика, отсутствующего в ДНК контроля (рис.). Возможно, что увеличение интервала плавления с повышением содержания 5-МЦ обусловлено возрастанием количества дестабилизированных областей в молекуле ДНК, вследствие чего эти молекулы становятся более гетерогенными системами [10]. Следовательно, наблюдаемые изменения параметров плавления и вида ДКП ДНК под действием изучаемых веществ связаны с изменением метилирования цитозина.

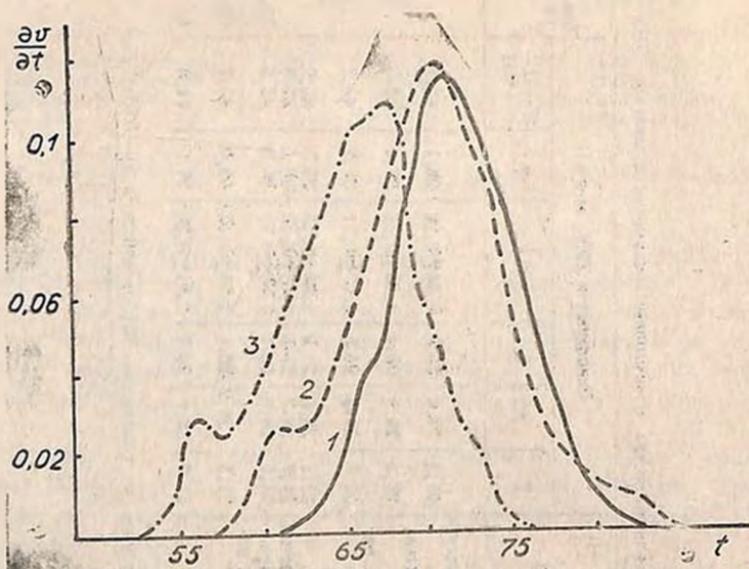


Рис. Дифференциальные кривые плавления ДНК больших полушарий: контрольных крыс (1), получивших пиррацетам (2), получивших соединение АН-346 (3). γ — степень спиральности ДНК.

При применении исследуемых антиамнестических средств изменения, происходящие в реакциях метилирования и вторичной структуре ДНК, по-видимому, зависят от степени выработки и упроченности условного рефлекса. Не исключено, что индуцируемое метилирование связано с изменениями в дезоксирибонуклеопротеиде с появлением новых доступных для метилирования участков, а также возможными сдвигами активности самих ДНК-метилаз, что может быть одним из последствий реорганизации соответствующих областей хроматина при их активации.

Таким образом, выработка условных рефлексов, характеризующаяся процессами запоминания, связана с транскрипцией и модификацией генома, функциональная активность которого может быть изменена при воздействиях на ЦНС антиамнестическими средствами.

STRUCTURE OF DNA AND THE POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION OF SOME ANTIAMNESIC DRUGS

Gharibian G. V., Jaghiatspanian I. A., Danielian I. S.,
Melikian H. H., Hakopian H. G., Babayan Yu. S., Avetissian M. G.,
Garibianian B. T.

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

The influence of some antiamnesic drugs on the character of methylation and the secondary structure of DNA in the specialized parts of the brain has been investigated in trained animals and in animals with retrograde amnesia. The analysis of the obtained data has shown that a marked increase in the content of 5-methylcytosine in the cortex of the large hemispheres is noted both during the formation of the conditioned reflex and during the use of antiamnesic drugs, the differential melting curve being modified, the melting point depressed and the melting interval being enlarged. It is assumed that the observed modifications in the methylation and the secondary structure of DNA may be correlated with the functional activity of the genome.

ЛИТЕРАТУРА

1. Третьяк Т. М. Успехи соврем. биол. т. 100, № 1 (4), с. 20—28, 1985.
2. Гуськова Я. В., Бурцева Н. И., Тушмалова Н. А., Ванюшин Б. Ф. Докл. АН СССР, т. 233, с. 993, 1977.
3. Bures J., Buresova O. G. *Comp. Physiol. Psychol.*, v. 56, p. 268—272, 1963.
4. Васильев В. К., Гарибян Д. В., Захарян Р. А., Галоян А. А., Ванюшин Е. Ф. Докл. АН СССР, т. 205, № 3, с. 721—723, 1972.
5. Ванюшин Б. Ф. Современные методы в биохимии. М. Медицина, 1964.
6. Бабалян Ю. С., Гарибян Д. В., Даниелян Н. С. и др. *Вопр. мед. химии*, т. 30, № 5, с. 92—94, 1984.
7. Giurgea C., Lefevre D. *Psychopharmacologia*, B. 20, S. 160—168, 1971.
8. Машковский М. Д., Рощина Л. Р., Полежаева Г. С. и др. *Хим. фармацевт. журн.*, т. 11, № 8, с. 132—139, 1977.
9. Galto J., Bonnet K. *Psychol. Rev.*, v. 75, p. 109, 1971.
10. Adams R. L. P., Eason R. *Nucleic Acids Res.* v. 12, № 14, p. 5869—5877, 1984.

Поступила 19. IX, 1991

УДК 577.15+577.3+591.39

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ МОЗГА ПРИ
СОВМЕСТНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ НА ОРГАНИЗМ КУРИНЫХ
ЭМБРИОНОВ НИЗКОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ СРЕДЫ
ИНКУБИРОВАНИЯ И УЛЬТРАФИОЛЕТОВОГО ОБЛУЧЕНИЯ.

СИМОНЯН А. А., СТЕПАНЯН Р. А., БАДАЛЯН Р. Б., АКОПОВА Т. М.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыяна НАН РА, Ереван

Изучено влияние кратковременных охлаждений инкубируемых куриных яиц в сочетании с ультрафиолетовым облучением на интенсивность течения в митохондриях мозга процессов окисления и изменения аденозинтрифосфатазной и креатинкиназной активности. Показано, что в отдельности низкие температуры и облучение способствуют стимулированию реакций окислительного фосфорилирования, однако при совместном действии этот эффект заметно уменьшается. В плодном периоде развития (15-суточные эмбрионы) уровень гидролитического расщепления АТФ оказывается достаточно высоким; в последующие сроки имеет место перераспределение этих процессов между отдельными структурными образованиями нервной клетки. Исследование активности креатинкиназы выявило превалирование активности фермента в эмбриональной стадии развития в цитоплазматической и в ранней постнатальной жизни — в митохондриальной фракции. Сделано предложение совместно использовать периодические охлаждения инкубируемых яиц и ультрафиолетовое облучение в птицеводстве с целью повышения жизнеспособности цыплят и продуктивности птицы.

В последние годы нами исследовались механизмы влияния низких температур инкубирования яиц на интенсивность окислительных процессов и активность некоторых ферментов митохондрий разных органов куриных эмбрионов в онтогенезе [1—4]. Показано, что, благодаря усиленню обменных процессов в промежутках между охлаждениями, имеет место более быстрое включение систем химической терморегуляции, обеспечивающих адаптацию организма к низким температурам, что, в свою очередь, обеспечивает более высокую степень сопротивляемости к воздействию последних и способствует сравнительно быстрой стабилизации температуры тела. Нами было выдвинуто предположение о необходимости подвергать инкубируемые куриные яйца периодическим кратковременным охлаждениям, способствующим повышению эффективности вывода молодняка и его качества.

В процессе этих исследований нами были предприняты эксперименты по изучению совместного действия на организм птиц низких температур, использованных при инкубировании яиц, и периодического ультрафиолетового облучения. Известно, что наряду с комплексом химических веществ и пищевых факторов в жизненных отправлениях

организма и стимуляции его различных функций, в частности репродуктивной и воспроизводительной, важную роль играют такие физические факторы среды, как температура, влажность воздуха и т. д.

К числу прогрессивных методов, успешно используемых в современном птицеводстве, относится природное ультрафиолетовое облучение, практически отсутствующее при содержании птиц в закрытых помещениях, в результате чего наблюдается снижение выводимости цыплят, особенно зимой и ранней весной. Ультрафиолетовое голодание может быть устранено введением в рацион птиц естественных источников витамина Д, в частности дефицитного и дорогостоящего витаминизированного рыбьего жира. В связи с отмеченным, важное значение приобретают искусственные источники ультрафиолетовой радиации, используемые в виде ртутно-кварцевых, бактерицидных, эритемных и других ламп.

Исходя из вышесказанного, мы провели серию опытов по изучению совместного действия ультрафиолетового облучения (УФО) и охлаждения инкубируемых куриных яиц на изменение процесса окислительного фосфорилирования (ОФ), АТРазной (НФ 3.6. 1.4) и креатинкиназной (КК) (НФ 2.7. 3.2) активностей в ткани мозга в определенные сроки эмбрионального и постэмбрионального развития.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 15- и 20-суточных эмбрионах и 5-суточных цыплятах. Яйца контрольной группы инкубировали при температуре, предусмотренной в существующих правилах. Охлаждение яиц начинали с 12-го дня инкубации при комнатной температуре в течение суток дважды по 30 мин. УФО проводили ртутно-кварцевой лампой мощностью 220 Вт. В первый раз облучение яиц производили до закладки в инкубаторы и затем эту процедуру повторяли через каждые четыре дня в течение 3 миш.

Методы по исследованию интенсивности процесса ОФ и АТРазной активности приведены в наших предыдущих работах [1, 3]. Активность КК измеряли методом Эннора-Розенберга по скорости накопления креатина и выражали в единицах фермента. Интенсивность окраски, зависящей от количества образовавшегося креатина, определяли на спектрофотометре при λ 520 нм и фиолетовом фильтре. Цитоплазматическую и митохондриальную фракции мозга выделяли согласно методике Лызловой [5]. Определение белка проводили биуретовым методом [6].

Результаты и обсуждение

Результаты по изучению скорости окисления в митохондриях мозга куриных эмбрионов разных сроков развития и подвергнутых одновременно охлаждению и УФО сведены в табл. 1. При УФО скорость окисления и интенсивность фосфорилирования на 15-й день инкубации по сравнению с контролем оказывается достаточно высокой,

перед вылуплением падает, а на 5-й день постнатальной жизни вновь значительно возрастает. Соответственно этому отмечается увеличение величины Р/О. При совместном действии охлаждения с УФО интенсивность процессов дыхания, фосфорилирования и величина Р/О на 15-е сутки колеблются в пределах высоких значений, а с дальнейшим развитием происходит их уменьшение по сравнению с контрольными величинами, несколько превышая показатели, отмечаемые при одном лишь УФО. В целом, многократное воздействие УФО на организм животных приводит к изменению скорости окислительных процессов. Учитывая наши прежние данные, можно сказать, что, если в отдельности низкие температуры и УФО в значительной степени стимулируют процесс ОФ, то при совместном их действии эта разница уменьшается.

Таблица 1
Влияние низких температур и ультрафиолетового облучения (УФО) на окисление и фосфорилирование в митохондриях мозга куриных эмбрионов (ΔO и ΔP в мкатомах/мг белка/45 мин)

Условия опыта	Эмбрионы						5-суточные цыплята		
	15-суточные			20-суточные			ΔO	ΔP	Р/О
Контроль	ΔO	ΔP	Р/О	ΔO	ΔP	Р/О	ΔO	ΔP	Р/О
УФО	1,83	1,57	0,97	2,75	1,95	0,71	2,47	2,38	0,69
УФО + охлаждение	2,31	2,72	1,16	1,98	1,30	0,66	2,93	3,13	1,05
	2,09	2,37	1,14	2,39	1,73	0,72	2,04	1,98	1,00

Примечание. Приведены средние данные из 7-8 опытов.

Как правило, увеличенное потребление кислорода приводит к соответствующему снижению Р/О или стимуляции АТФазных реакций. В табл. 2 отражены результаты изменения АТФазной активности митохондрий мозга куриных эмбрионов, подвергшихся двукратному охлаждению, начиная с 12-го дня инкубации и УФО с первого дня закладки яиц в инкубаторы. Активность фермента определяли в митохондриальной, мембранной и растворимой фракциях в присутствии Mg^{2+} и бикарбоната, как активатора этого фермента. Как следует из приведенных данных, активность АТФазы в указанных фракциях по ходу развития зародыша подвергается неодинаковому изменению. В митохондриальной фракции по сравнению с контролем активность фермента при охлаждении и УФО + охлаждение подвергается значительному возрастанию, иногда до 44% (20-суточные эмбрионы). По мере развития плода вплоть до его вылупления активность фермента в мембранной фракции при всех условиях эксперимента увеличивается. На 15-ые сутки развития без добавления активаторов она в случае охлаждения возрастает на 63%, а при действии и низких температур, и УФО — на 76%. На 5-й день постнатальной жизни АТФазная активность либо остается на уровне контроля, либо уменьшается (Mg^{2+} и HCO_3^-).

Иная картина наблюдается в растворимой фракции, при этом резкое возрастание активности фермента наблюдается на 15-е сутки инкубации. Примечательно, что совместное действие УФО с охлаждением сопровождается высшим подъемом активности фермента — от 45 до 108%. Перед вылуплением АТРазная активность по сравнению с контролем падает у облученных эмбрионов и повышается в случае совместного действия облучения и охлаждения. На 5-й день постнатальной жизни в митохондриальной и мембранной фракциях активность фермента или слегка понижается, или остается на первоначальном уровне. В растворимой фракции в присутствии Mg^{2+} она возрастает до 30%, а в присутствии Mg^{2+} и HCO_3^- всего на 10%. Полученные результаты свидетельствуют о различной степени эффективности низких температур и УФО в отношении АТР-гидролазной реакции.

Таблица 2

Изменение АТРазной активности в разных фракциях мозга под влиянием низких температур инкубирования яиц и ультрафиолетового облучения (УФО). (P_1 в мкатомах на мг белка/30 мин)

Условия опыта		Без активаторов			Mg^{2+}			$Mg^{2+} - HCO_3^-$		
		кон- троль	УФО	УФО+ охлаж- дение	кон- троль	УФО	УФО+ охлаж- дение	кон- троль	УФО	УФО+ охлаж- дение
15-суточные эмбрионы	митохондриальная фракция	3,60	3,85	4,69	5,82	5,89	6,08	10,43	8,50	9,54
	митохондриальные мембраны	2,46	4,02	4,33	5,21	6,54	7,15	8,19	9,21	11,96
	растворимая фракция	1,98	2,97	4,13	5,25	5,46	7,63	6,94	7,99	12,06
20-суточные эмбрионы	митохондриальная фракция	5,41	6,62	7,59	6,78	8,92	8,82	9,73	14,06	11,69
	митохондриальные мембраны	5,58	5,03	5,85	8,86	7,68	9,50	10,63	10,86	12,33
	растворимая фракция	3,14	2,51	2,83	7,06	6,30	8,17	9,31	8,10	9,93
5-суточные шпалта	митохондриальная фракция	5,33	5,66	6,20	8,03	7,71	7,91	13,86	12,50	11,42
	митохондриальные мембраны	6,50	5,30	6,59	9,12	7,46	8,47	14,08	9,44	10,95
	растворимая фракция	3,01	3,19	3,66	7,20	9,38	9,43	11,60	13,06	12,67

Примечание. Приведены средние данные из 5—6 опытов.

Анализируя приведенные в таблице данные, можно отметить, что при многократном охлаждении инкубируемых куриных яиц на фоне УФО имеет место интенсификация окислительных процессов и гидролиза АТР в плодном периоде развития. В последующие периоды развития, по-видимому, происходит перераспределение в картине выраженности этих процессов между отдельными структурными образованиями нервной клетки.

Периодические охлаждения инкубируемых яиц на фоне УФО серьезным образом сказываются и на изменениях активности КК. Изучение ее динамики в митохондриальной и цитоплазматической фракциях мозга кур в разные сроки развития свидетельствует (табл. 3), что повышение активности фермента в митохондриях мозга облученных куриных эмбрионов начинает проявляться только со стадии вылупления с последующим прогрессивным возрастанием, достигающим в мозгу 5-дневных цыплят приблизительно 45% от уровня активности контрольной группы животных. При совместном действии УФО и охлаждения активности фермента оказывается невысокой, а к моменту вылупления даже значительно пониженной, что, однако, через несколько дней после вылупления цыпленка сменяется значительным возрастанием активности КК (48%). Представляют интерес изменения динамики активности цитоплазматической формы КК. У группы животных, подвергнутых действию УФО в плодном периоде развития и перед вылуплением, обнаруживается высокий уровень активности, который после вылупления заметно снижается. Сочетанное действие низких температур с УФО характеризуется тенденцией к понижению активности КК, за исключением ее небольшого возрастания на стадии вылупления. Сравнительное исследование активности двух креатинкиназ в ткани мозга кур в онтогенезе позволяет заключить о превалировании ее на эмбриональной стадии развития в цитоплазме, а в постнатальной жизни — в митохондриальной фракции.

Таблица 3
Изменение активности креатинкиназы в разных фракциях мозга куриного эмбриона под влиянием низких температур инкубируемых яиц и ультрафиолетового облучения (УФО) (мкМ креатина/мг белка/мин).

Возраст	Митохондрии			Цитоплазма		
	контроль	УФО	УФО + охлаждение	контроль	УФО	УФО + охлаждение
15-суточные эмбрионы	8,68	8,88	9,84	12,02	14,44	11,29
20-суточные эмбрионы	13,53	14,99	10,97	12,53	15,93	14,69
5-суточные цыплята	12,64	18,31	18,65	14,91	16,06	13,85

Примечание. Приведены средние данные из 4—5 опытов.

Полученные данные позволяют заключить об удавшейся попытке выявить некоторые особенности саморегуляции энергетического обмена в митохондриях и цитоплазме на разных этапах онтогенеза. Установлено, что при периодическом охлаждении в сочетании с УФО происходит возрастание интенсивности течения окислительных процессов, неодинаковая степень активирования АТР-гидролазной реакции и активности КК. Таким образом, при периодических кратковременных охлаждениях на фоне УФО происходят заметные изменения в отдельных

реакциях энергетического метаболизма, обуславливающие нормальную теплоотдачу инкубируемых яиц.

В настоящее время накоплен обширный экспериментальный материал, свидетельствующий о нарушении биоэнергетических механизмов в митохондриях при воздействии на них повышенных и пониженных температур; изучен механизм тепловой и холодовой инактивации на различных уровнях молекулярной организации дыхательной цепи. Это касается фосфорилирующих и нефосфорилирующих частиц переноса электронов [7—9] на уровне цельных митохондрий [10, 11] и изолированных полиферментных комплексов дыхательной цепи [12]. В частности, показано, что кратковременное воздействие высокой температуры на организм подавляет дыхательную активность митохондрий скелетных мышц при одновременной стимуляции процессов фосфорилирования. При многократных воздействиях тепла различной интенсивности способность митохондрий скелетных мышц к ОФ изменяется [13]. Согласно некоторым указаниям [14], повышение температурной устойчивости цыплят происходит при их эмбриональном развитии в условиях сниженной или периодически изменяющейся температуры. Литература по вопросам инкубации содержит данные о разностороннем влиянии изменений инкубационной температуры на биологические особенности и хозяйственные качества выведенного молодняка. С другой стороны, показано, что кратковременное охлаждение вызывает повышение теплопродукции за счет возрастания избыточного потребления кислорода, то есть помимо основной теплопродукции происходит дополнительная регуляторная выработка тепла, удерживающая температуру тела на обычном уровне [9].

Нет необходимости разъяснять практическое значение повышенной температурной устойчивости цыплят в начале их выращивания. Следует лишь отметить, что высокая сопротивляемость холоду связана со многими другими свойствами организма, определяющими его жизнеспособность. Бесспорно, что в комплексе мероприятий, направленных на улучшение выращивания молодняка и повышение продуктивности взрослого поголовья, важную роль играет снижение микробной загрязненности воздуха и воды. Это может быть легко достигнуто применением различных источников УФО, биологическая и экологическая эффективность которого экспериментально подтверждена [15]. Учитывая научную обоснованность и высокую эффективность использования низких температур инкубации яиц и УФО в птицеводстве, мы предлагаем их совместное использование для повышения инкубационных качеств яиц, а главное — продуктивности птицы.

THE FUNCTION OF BRAIN MITOCHONDRIA OF HEN EMBRYONS UNDER THE INFLUENCE OF LOW TEMPERATURE AND ULTRAVIOLET TREATMENT

SIMONIAN A. A., STEPANIAN R. A., BADALIAN R. B., AKOPOVA T. M.

H. Kh. Buniatian Institute of Biochemistry Natl. Acad. Sci. of Rep. Armenia, Yerevan

The influence of short time cooling and ultraviolet treatment of the incubated hen eggs on the intensity of oxidative processes and adenosine triphosphatase and creatinekinase activities of brain are studied. It is shown that low temperature and ultraviolet treatment separately have stimulated oxidative phosphorylation, but these two treatments together decrease this difference. In 15-day embryos the ATP-hydrolysis is high, afterwards redistribution of these processes between different structures in neuronal cell takes place. The investigation of creatinekinase shows that the activity of the enzyme is in the cytoplasm, but at postnatal period it is in the mitochondrial fraction. It is proposed to use the periodical cooling and ultraviolet treatment in poultry to enhance the life-ability of chickens and hens productivity.

ЛИТЕРАТУРА

1. Симонян А. А., Степанян Р. А., Месропян Е. Б. Биол. журн. Армении, т. 40, с. 387—390, 1987.
2. Симонян А. А., Степанян Р. А., Месропян Е. Б. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 24, с. 432—436, 1988.
3. Симонян А. А., Степанян Р. А., Бадалян Р. Б., Укр. биохим. журн., т. 61, с. 69—72, 1989.
4. Степанян Р. А., Симонян А. А. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 26, с. 73—77, 1990.
5. Лыздова С. Н. Фосфагенкиназы, Л., ЛГУ, 1974.
6. Itzhack Ruth F., Gill D. M. *Analyt. Biochem.*, v. 9, p. 401—411, 1964.
7. Лузиков В. Н. Структура и функция ферментов (под ред. С. Е. Северина), М., МГУ, вып. 2, с. 21—62, 1973.
8. Лузиков В. Н., Сакс В. А., Березин И. В. Биохимия, т. 35, с. 1053—1055, 197С.
9. Скулочев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи, М., АН СССР, 1962.
10. Алматов К. Т., Аулов Д. М., Ахмеров Р. П., Рахимов М. М. *Вопр. мед. химии*, т. 23, с. 96—101, 1977.
11. Северин С. Е., Скулочев В. П., Маслов С. П., Бенедиктов И. Н., Шестаков В. Г. *Докл. АН СССР*, т. 131, с. 1447—1450, 1960.
12. Рахимов М. М., Алматов К. Т. Биохимия, т. 42, с. 1852—1863, 1977.
13. Акрамов Ш. И. — В кн.: *Адаптация организма к высокой температуре среды*. Ташкент, АН УзССР, с. 63—64, 1980.
14. Хаскин В. В. *Физиол. журн. СССР*, т. 49, с. 1254—1259, 1963.
15. Карапетян С. К., Кочарян Р. Г. Биологическое действие искусственных источников ультрафиолетового излучения на животный организм, Ереван, АН АрмССР, 1977.

Поступила 20. XII, 1991:

УДК 577.06:578.61:591.415

АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА
НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС

РОСТОМЯН М. А., АБРАМЯН К. С., КАЛАШЯН С. П.

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

Проведено исследование чувствительности аденилатциклазы (АЦ) надпочечников крысы к действию условий, связанных с гистохимическим выявлением фермента. Опыты с различной длительностью фиксации и варьированием состава инкубационной смеси позволили показать множественный характер распределения АЦ. Примечательно, что АЦ, локализованная в различных структурных образованиях надпочечника— волокнах интрамурального ганглия, секреторных гранулах и капиллярах, отличается неодинаковой чувствительностью к действию этих факторов. Наибольшей чувствительностью отличается микроциркуляторное русло, АЦ которого может быть выявлена лишь при щадящих условиях, предполагающих подбор соответствующих фиксирующих смесей, уменьшение их ингибирующего действия сокращением времени воздействия, а также снижение концентрации ионов свинца. Различная чувствительность, а следовательно, и отличающиеся свойства АЦ указанных компонентов надпочечника рассматриваются в связи с особенностями регуляции этой сложной железы внутренней секреции.

Ранее сообщалось о возможности светомикроскопического выявления АЦ в интрамуральном нервном ганглии надпочечников с помощью гистохимической реакции, основанной на связывании и последующей визуализации нирофосфата, выделяющегося из субстрата под влиянием активности АЦ [1].

Изучение чувствительности этой реакции к различным эффекторам показало, что она активируется норadreналином и может изменяться под влиянием факторов, действующих на гормональный фон организма. В частности, было показано, что при тиреодэктомии [2] и действии адренолитиков [3] резко нарастает чувствительность АЦ именно к тем гормонам, уровень которых был снижен под влиянием экспериментальных воздействий. Все эти факты указывали на то, что АЦ, выявляемая гистохимическими методами, может сохранять не только активность, но и чувствительность к различным эффекторам. Однако при этом озадачивал тот факт, что активность проявлялась только в интрамуральном нервном ганглии мозгового слоя. Между тем, известно, что, несмотря на чрезвычайно высокую лабильность АЦ надпочечников, ее активность довольно высока не только в мозговом, но и в корковом слое [4, 5].

Позднее с помощью аденилиамидодифосфата (АИДФ) было показано, что АЦ гистохимическим методом может быть обнаружена также в гранулярном компоненте надпочечника, и в частности в хромоффинных гранулах [6]. Согласно данным литературы, активность АЦ хромоффинных гранул составляет всего лишь 10—15% от активности всего мозгового слоя [7]. Это указывало на то, что немалая доля активности АЦ надпочечников не выявляется и теряется в процессе препарирования материала для гистохимического выявления АЦ.

Целью настоящей работы является исследование влияния различных факторов, связанных с обработкой материала, на активность АЦ и выделение клеток или структур надпочечника, отличающихся повышенной чувствительностью АЦ к различным этапам процедуры выявления этого фермента.

Материалы и методы

Гистохимическое выявление АЦ проводили по прописи, предложенной ранее [1, 6], с варьированием условий фиксации материала.

Исследования проведены на замороженных срезах надпочечников более ста крыс, фиксированных интраартериальной перфузией. Для наркотизирования животных применяли эфир и нембутал. В качестве фиксирующих смесей использовали 2,5%-ный глютаральдегид на физиологическом растворе, на 0,1 М трис-малеатном или 0,1 М какодилловом буфере, pH 7,4, 1%-ный параформальдегид на 0,1 М какодилловом или трис-малеатном буфере и 1%-ную смесь параформальдегида с 1,25%-ным глютаральдегидом на трис-HCl буфере, pH 7,4. Срезы готовили сразу после перфузии животного фиксирующей смесью, а также через 1—3 и 18—20 ч после дополнительного фиксирования перфузированных надпочечников погружением в фиксатор такого же состава.

Инкубацию срезов проводили при температуре 32—34° в течение 5—60 мин. Время инкубации зависело от примененных фиксирующих смесей и условий фиксации материала.

Использовали следующий состав инкубационной смеси: 0,1 М трис-малеатный, трис-HCl или какодилловый буфер, pH 7,4, с 8% глюкозы или сахарозы, в качестве субстрата употребляли 0,5 ммоль АТР с примесью ванадия («Sigma», США) или 0,5—1 ммоль АИДФ («Sigma»), 4 ммоль сернокислого магния, 2 ммоль теофиллина («Sigma») и 1,5—4,8 ммоль азотнокислого свинца, добавляемого в инкубационную среду непосредственно перед употреблением. После инкубации срезы последовательно промывали в воде, в 1%-ной уксусной кислоте — 1 мин, в дистиллированной воде и 5 мин в 0,5%-ном растворе сульфида натрия для визуализации пирофосфата свинца, маркирующего места проявления ферментативной активности. Срезы после промывки монтировали на предметные стекла и заключали в глицерин-желатину. Продукт ферментативной реакции в виде темного осадка отлагался в местах проявления активности АЦ.

Для определения специфичности реакции проведены следующие контрольные инкубации: без субстрата, с тепловой денатурацией, с замещением АТР на другие фосфатсодержащие субстраты, такие как АМР, АДР и АИДФ. Кроме того, в состав инкубационной среды вводили ингибиторы ферментов — кислой фосфатазы (тарtrato), щелочной фосфатазы (цистеин) и АТРаз (уабани, фторид натрия).

Данные контрольных экспериментов показали, что в материале, инкубированном в среде без субстрата, реакция не проявляется. При нагревании срезов до 70° в течение 5 мин и их последующей инкубации в среде для выявления АЦ, окраска резко ослаблялась и полностью исчезала в срезах, прогретых до 80°. Отсутствие реакции после теплового воздействия свидетельствует о ферментативном характере реакции и об отсутствии осадков, обусловленных неэнзиматическим гидролизом АТР ионами свинца. При инкубации срезов с другими, неспецифическими для АЦ фосфатсодержащими субстратами — АМР и АДР, окраска в них не проявлялась. Результаты по инкубации срезов с АИДФ, выявившие некоторые особенности реагирования различных структурных компонентов надпочечника, будут изложены ниже. Добавление в инкубационную среду ингибиторов кислых, щелочных фосфатаз и нуклеозидтрифосфатаз не снимало реакцию. Эти факты свидетельствуют о том, что применяемая реакция на АЦ обусловлена именно этим, а не каким-либо другим ферментом, при действии которого высвобождаются фосфаты.

Результаты и обсуждение

В ранее проведенных исследованиях АЦ выявляли на замороженных срезах надпочечников крыс после перфузии 2,5%-ным забуференным глютаральдегидом и дополнительной фиксации материала в фиксирующей смеси такого же состава в течение 18—20 ч. После 30—60-минутной инкубации срезов в среде, предназначенной для выявления АЦ и содержащей в качестве субстрата АТР, реакция проявлялась в нервных волокнах интрамурального нервного ганглия мозгового слоя. Четкое окрашивание воспроизводилось у всех интактных животных и напоминало картину, получаемую при импрегнации препаратов серебром.

При менее продолжительной (1—3 ч) дополнительной фиксации надпочечников и последующем выявлении АЦ, кроме нервных волокон интрамурального ганглия, иногда окрашиваются и капилляры, преимущественно коркового слоя. Причем интенсивность окраски по периферии среза выражена слабее или вообще отсутствует. Это, по всей вероятности, можно объяснить большей длительностью воздействия фиксатора на поверхностные слои надпочечника, в связи с чем активность фермента по периферии среза ингибируется сильнее по сравнению с глубинными областями органа.

При гистохимическом исследовании АЦ непосредственно после фиксации крыс перфузией, то есть при условии, когда длительность

воздействия фиксатора минимальна и не превышает нескольких минут, в срезах надпочечников, наряду с интенсивно окрашенными нервными волокнами интрамурального нервного ганглия, в мозговом слое можно видеть окрашенную сеть кровеносных капилляров. В корковом слое надпочечников капилляры окрашены несколько слабее и имеют преимущественно радиальную направленность между клетками столбчатого слоя. Иными словами, при кратковременной фиксации глутаральдегидом интенсивность реакции на АЦ капилляров мозгового слоя несколько выше, чем капилляров коркового слоя, но ее чувствительность к ингибирующему действию глутаральдегида выражена сильнее, чем в корковом слое.

Описанные результаты свидетельствуют о том, что удлинение времени фиксации материала приводит к постепенному ослаблению и исчезновению реакции в капиллярах, тогда как реакция на АЦ в нервном ганглии проявляется всегда четко. Из этих данных напрашивается вывод о том, что АЦ кровеносных капилляров надпочечников значительно чувствительнее к ингибирующему влиянию глутаральдегида, чем в нервных волокнах интрамурального ганглия, в связи с чем через сутки после дополнительной фиксации никакой реакции на АЦ в кровеносных капиллярах выявить не удается.

Однако опыты показали, что потеря активности АЦ в капиллярах наблюдается не только после длительной фиксации надпочечников, но и при хранении кратковременно фиксированных срезов надпочечников в буферном растворе (в холодильнике) в течение ночи. Если проследить во времени потерю активности АЦ при хранении срезов надпочечников в буфере и сопоставить с данными по длительности действия глутаральдегида, можно отметить, что снижение активности при хранении в буфере несколько меньше, чем под влиянием глутаральдегида. Эти факты свидетельствуют о чрезвычайно высокой лабильности АЦ, локализованной в капиллярах коркового и, особенно, мозгового слоя надпочечников. Активность АЦ резко снижается не только при действии глутаральдегида, но даже при длительной промывке в буферных растворах.

В отличие от капилляров, активность АЦ в интрамуральном нервном ганглии можно выявить и при более грубых воздействиях. Окраска в нервных волокнах обнаруживается даже через несколько дней и недель после хранения в буфере и даже фиксаторе. При этом она сохраняет чувствительность к действию медиаторов и других эффектов.

Исследования показали, что при кратковременной фиксации и различной длительности инкубации срезов в среде для выявления АЦ в течение 5—60 мин наблюдается следующая последовательность выявления структур, проявляющих активность АЦ. Через 5—15 мин инкубации слабое окрашивание обнаруживается в нервных элементах интрамурального ганглия. Оптимальное время для выявления этих структур — 20—25 мин. Через 25—30 мин инкубации начинается сла-

бое окрашивание капиллярной сети мозгового слоя и несколько позже коркового. Отчетливая реакция в капиллярах надпочечников у большинства животных отмечается через 60 мин инкубации.

Таким образом, после кратковременной фиксации активность АЦ в надпочечниках значительно выше, на что указывает обнаружение ее в капиллярах и заметное сокращение времени инкубации, необходимого для выявления фермента в интрамуральном ганглии. Это отмечается как в материале, инкубированном непосредственно после перфузии, так и в срезах, промытых после перфузии в буфере в течение ночи. Этот факт также свидетельствует об ингибирующем влиянии, оказываемом глютаральдегидом при его длительном воздействии на АЦ интрамурального ганглия надпочечника. Однако, как видно из вышеприведенных данных, АЦ интрамурального ганглия значительно устойчивее, чем АЦ капилляров надпочечника к действию факторов, связанных с гистохимическим выявлением АЦ.

Для выявления АЦ в интрамуральных ганглиях не имеет существенного значения качество глютаральдегида, а также скорость перфузии, тогда как при выявлении АЦ в кровеносном русле надпочечников предпочтительнее быстрая перфузия дистиллированным глютаральдегидом. АЦ нервных окончаний менее чувствительна не только к длительности фиксации и вышеуказанным факторам, но и к концентрации солей свинца, присутствующих в инкубационной среде и может выявляться при 4,8 ммоль азотнокислого свинца в довольно широком ряду значений рН от 6,4 до 8,4. При этом сохраняется чувствительность АЦ к норадреналину, особенно четко проявляющаяся при рН 8,4.

В отличие от результатов, полученных при использовании АТР, природного субстрата АЦ, способствующего выявлению реакции в интрамуральных ганглиях, применение синтезированного, но считающегося специфичным для АЦ субстрата—АИДФ, при обычных условиях выявления АЦ (после фиксации перфузией и дополнительной фиксации в течение 18—20 ч), не давало окрашивания волокон интрамурального ганглия. Окраска не проявлялась даже через 24 ч инкубации, реакция не обнаруживалась и после воздействия активаторов. Однако после кратковременной фиксации в глютаральдегиде применение АИДФ позволило выявить такую же картину, как с АТР, то есть реакция на АЦ выявлялась в нервных волокнах и сосудистой сети коркового и мозгового слоев надпочечника. Окрашивание обнаруживалось и в гранулярном компоненте железистых клеток (только при высоких значениях рН инкубационной среды — 8,4—8,9), что, очевидно, связано с проявлением реакции на АЦ в секреторных гранулах. В отличие от АТР, реакция с АИДФ развивается медленно. Начало выявления реакции на АЦ наблюдается лишь через несколько часов инкубации.

Выявлению АЦ в сосудистой системе надпочечника в наибольшей мере способствует фиксация 1%-ным параформальдегидом. Судя по полученным результатам, параформальдегид способствует большей сохранности ферментативной активности. АЦ в капиллярной сети выяв-

ляется даже после 20-часовой дополнительной постфиксации надпочечников, для выявления капилляров которых достаточно 10—20-минутная инкубация. Так же, как и после глотаральдегида, активность в мозговом слое выявляется раньше, чем в корковом.

Приведенные результаты гистохимического выявления АЦ в надпочечниках на светомикроскопическом уровне свидетельствуют о том, что определяемая биохимическими методами суммарная активность АЦ надпочечников, локализуется по крайней мере в трех различных структурных образованиях органа — гранулах, капиллярах и нервных элементах. Есть данные и об активности АЦ, проявляющейся в плазматических мембранах хромаффинных клеток [12]. Принимая во внимание функциональные различия секреторных клеток, составляющих эту сложную железу внутренней секреции, можно объяснить своеобразие реактивных ответов АЦ этих образований на действие медиаторов и других эффекторов. Так, было показано, что АЦ мембран хромаффинных гранул проявляет чувствительность к АХ и карбохолу [8, 9], тогда как АЦ плазматических мембран мозгового слоя нечувствительна к этим агентам [8]. Различия обнаружены и в отношении условий гистохимического выявления фермента, локализованного в различных структурных образованиях надпочечника. Они могут быть обусловлены составом фиксатора и характером его применения, составом инкубационной среды и использованных субстратов.

Своеобразие реакций, присущих АЦ различных структур, по-видимому, отражает специфическую роль системы АЦ—сАМР в проявлении процессов, характеризующих функциональное назначение этих структур. Так, исследованиями показано, что АЦ мембран хромаффинных гранул играет определенную роль в процессе секреции адреналина, на что указывало параллельное нарастание активности АЦ при высвобождении адреналина [10]. И, хотя биологическое значение этого параллелизма не совсем ясно, вопросы, связанные с выяснением механизмов действия системы АЦ—сАМР в мембранах хромаффинных гранул, заинтересованно обсуждаются в литературе [11—13, 14].

Что касается роли АЦ в интрамуральном нервном ганглии, то этот вопрос в литературе не обсуждался. Как было показано ранее, нервные волокна интрамурального ганглия, проявляющие четко выраженную реакцию на АЦ, преимущественно связаны с островками нор-адреналинпродуцирующих клеток и как бы объединяют их в единую систему [1, 6]. По всей вероятности, регуляция функций этих клеток в большей мере, чем адреналинпродуцирующих, зависит от нервных влияний, медируемых посредством системы АЦ—сАМР.

АЦ в провеносных капиллярах имеет определенное значение в процессе регуляции кровообращения и проницаемости капилляров. Сдвиги в химическом составе крови, притекающей к органу, могут служить сигналом для изменения активности АЦ, уровня сАМР и, как следствие, просвета капилляров и связанной с ним скоростью оттока продуктов секреторной деятельности надпочечников.

Выявленные различия в свойствах АЦ указанных структурных образований этой сложной железы, несомненно, свидетельствуют о возможности дифференцированной и тонкой регуляции функций различных компонентов надпочечника, обуславливающей его работу как целостного органа, обеспечивающего нормальное функционирование организма.

ADENYLATE CYCLASE OF MICROCIRCULATORY BED OF RAT ADRENALS

ROSTOMIAN M. A., ABRAMIAN K. S.,

H. Kh. Buniattan Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci., of Rep. Armenia, Yerevan

The effect of histochemical procedures on the sensitivity of adeny- late cyclase (AC) of rat adrenals was studied. Variations with the con- tents of incubation media, time of fixation and composition of fixative allowed to show the existence of multiple pools of AC differed by their localization: in intramural ganglions, secretory granules and capil- laries.

Different sensitivity of mentioned pools of AC is discussed in con- nection with the peculiarities of the regulation of this compound gland of inner secretion.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ростомян М. А., Абрамян К. С. Арх. анат: г. /6, № 1, с. 56—59, 1979.
2. Ростомян М. А., Гаспарян Э. И. Тез. II Всес. симп. «Циклазная система и ее роль в регуляции клеточного обмена», Ташкент, с. 55—56, 1978.
3. Камалян Р. Г., Ростомян М. А. Биол. журн. Армении, т. 35, № 10, с. 825—830, 1983.
4. Fihn F. M., Montibelled J. A., Ushiyama Y., Hoffman K. J. Biol. Chem., v. 250, p. 1186—1192, 1975.
5. Grahame-Smith D. G., Butcher R. W., Ney R. L., Sutherland E. W. J. Biol. Chem., v. 242, № 23, p. 5335—5346, 1967.
6. Ростомян М. А., Абрамян К. С. Нейрохимия, т. 4, № 3, с. 172—176, 1985.
7. Zinder O., Menard R., Lovenberg W., Pollard H. B. Biochem. Biophys. Res. Comm., v. 79, № 3, p. 707—712, 1977.
8. Guidotti A., Costa E. J. Pharm. Exptl. Ther., v. 189, № 3, p. 655—675, 1974.
9. Nikodievik O., Nikodievik B., Zinder O., Yu M.—W., Guroff G., Pollard H. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 73, p. 771—774, 1976.
10. Zinder O., Nikodievik O., Hoffman Ph. G., Pollard H. B. J. Biol. Chem., v. 251, № 7, p. 2179—2181, 1976.
11. Pollard H. B., Pazoles Ch. J., Creutz C. E., Zinder O. Int. Rev. of Cytology, v. 58, p. 159—197, 1979.
12. Wincler H., Carmichael S. W. The Secretory Granule. (eds. Poisner and Trifaro), Elsevier Biochemical Press, p. 3—79, 1982.
13. Wincler H., Westhead E. W. Neuroscience, v. 5, p. 1803—1923, 1980.
14. Zinder O., Pollard H. B. Proc. 4th Int. Catecholamine Symp., v. 1, p. 343—345, 1979.

Поступила 1. VII 1993

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 616.895.8

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МОЗГОВОЙ ФОСФОГЛИЦЕРАТМУТАЗЫ
С ИЗОФЕРМЕНТАМИ ЕНОЛАЗЫ

КАРАПЕТЯН Н. Г.

Институт молекулярной биологии НАН Армении, Ереван

Гликолиз как древний и консервативный путь получения энергии катализируется индивидуальными ферментами, хотя в последние годы большое внимание уделяется изучению взаимодействия между ними, как это, в частности, установили Ovadi и Keleti на примере альдолазы и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы из мышц кролика [1]. Mc Gregor и соавт. показали факт взаимодействия альдолазы из печени кролика с фруктозо-1,6-бисфосфатазой [2]. Имеются данные о способности глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы взаимодействовать не только с альдолазой, но и с другими ферментами, например, транскетотазой из дрожжей [3] и цитоплазматической аспаратаминотрансферазой из мышц кролика [4]. Вместе с тем, сведения о функциональной значимости взаимодействия очищенных ферментов гликолиза между собой или с другими ферментами метаболизма весьма скудны и нуждаются в дальнейшем пополнении.

Учитывая главенствующую распорядительную роль ЦНС в регуляции и интеграции биохимических процессов целостного организма, представляется актуальным изучение особенностей процесса комплексобразования ферментов в головном мозгу. Выявление и всестороннее исследование принципов взаимодействия этих белков может пролить свет на современное понимание ряда функциональных назначений нервной ткани. Поэтому целью настоящей работы явилось изучение взаимодействия между фосфоглицератмутазой (ФГМ; мозговой изофермент, иммунологически отличающийся от других форм) и изоферментами енолазы: нейроспецифическим — $\gamma\gamma$, глияльным, печеночным (встречающимся и в других тканях) — $\alpha\alpha$, мышечным — $\beta\beta$. В работе исследовалось также взаимодействие ФГМ с дрожжевой енолазой.

ФГМ, а также $\alpha\alpha$ и $\gamma\gamma$ -изоферменты енолазы были выделены из тканей головного мозга быка и очищены по описанной ранее методике [5, 6]. Использовались также коммерческие препараты $\beta\beta$ -изофермен-

та енoлазы из мышцы кролика и дрожжей («Sigma», США), отличающиеся своей электрофоретической гомогенностью в системе Леммли [7]. Определение специфической активности очищенных препаратов α -енолазы, γ -енолазы и мугазы проводили в 50 мкМ имидазольном буфере в присутствии 3 мМ $MgCl_2$ при 25° и pH 7,3; она составляла 50,45 и 200 ед/мг соответственно.

Способность к ассоциации и диссоциации комплекса енoлаза-мугаза изучалась методом анизотропии флуоресценции. Для этого один из ферментов подвергали предварительной 30-минутной инкубации с флуоресцентным красителем флуоресценции изотиоцианатом (ФИТЦ) в концентрации 20—40 мМ, ковалентно связывающимся с белком и практически не меняющим его ферментативной активности [8], затем до и после добавления второго фермента определяли анизотропию флуоресценции меченого белка.

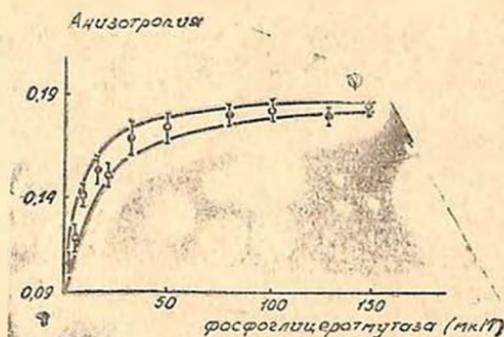


Рис. 1. Титрование меченой ФИТЦ γ -енолазы ФГМ.
 ○ — в отсутствие, ● — в присутствии 2-фосфоэлицерата

К меченой ФИТЦ γ -енолазе в конечной концентрации 1 мкМ добавляли различные концентрации ФГМ и спустя 20 мин, когда система уравнивалась, определяли анизотропию флуоресценции. С целью выявления возможного влияния общего субстрата изученных ферментов на процесс комплексообразования (рис. 1) подобное титрование проводилось и в присутствии 500 мкМ 2-фосфоэлицерата, формы кривых которого свидетельствуют о реализации этого процесса, хотя и не представлялось возможным выявить различия в экспериментах с наличием и отсутствием насыщающей концентрации 2-фосфоэлицерата в связи с их нахождением в пределах ошибки измерений.

В следующей серии исследований к 4 мкМ меченой ФИТЦ γ -енолазы добавляли 165 мкМ ФГМ и в течение 20 мин вели наблюдения за повышением анизотропии флуоресценции, то есть за образованием комплекса енoлаза-ФГМ. Последующее 20-кратное разбавление смеси буфером характеризовалось диссоциацией комплекса с понижением анизотропии флуоресценции: до $K_d = 40$ мкМ (рис. 2, а).

При проведении кинетических исследований по изучению процесса комплексообразования, было установлено увеличение K γ -ено-

лазы от 70 до 100 мкМ в присутствии 7,4 мкМ ФГМ, что свидетельствует об ингибирующем эффекте комплекса ФГМ — 2-фосфоглицерат — енолаза на активность енолазы в реакции 2-фосфоглицерат — фосфоенолпируват.

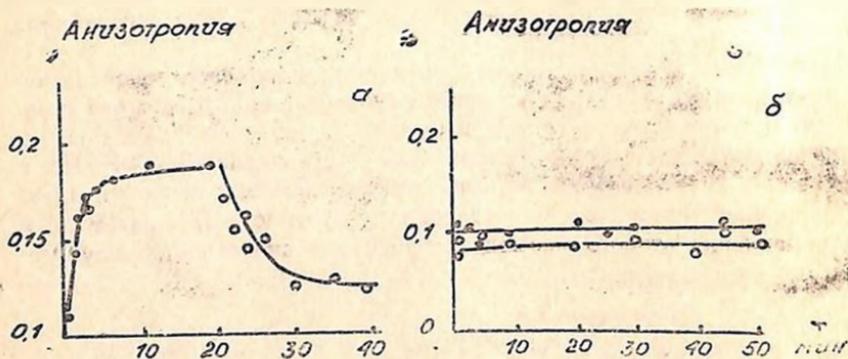


Рис. 2. Анизотропия флуоресценции образования и диссоциации комплекса енолаза-ФГМ. а — α енолаза, б — $\alpha\alpha$ (○) и $\beta\beta$ (●) енолазы. По оси абсцисс обозначено время (мин)

Для выявления специфичности данного взаимодействия подобные исследования проводили также с мечеными ФИТЦ $\alpha\alpha$ и $\beta\beta$ изоферментами енолазы (в конечной концентрации 1 мкМ). В присутствии различных концентраций ФГМ (0—100 мкМ) в течение 50 мин. измеряли анизотропию флуоресценции ферментов. Однако, как видно из рис. 2, б, в этих экспериментах не было выявлено сколько-нибудь заметных изменений анизотропии флуоресценции, что, очевидно, можно объяснить отсутствием взаимодействия между ФГМ и $\alpha\alpha$ или $\beta\beta$ изоферментами енолазы. Эти данные позволяют предположить наличие в нейронах головного мозга особых систем регуляции гликолиза, что может иметь свою специфику и осуществляться не только ключевыми ферментами, но и образованием комплексов между мозгоспецифическими белками этого важнейшего метаболического пути.

При изучении взаимодействия различных концентраций ФГМ из мозга быка с добавленной к ней меченой ФИТЦ дрожжевой енолазой (1,5 мкМ) наблюдалось повышение анизотропии флуоресценции (рис. 3, а). В случае добавления к меченой ФИТЦ дрожжевой енолазе в той же концентрации 40 мкМ ФГМ в течение 20 мин имело место повышение анизотропии флуоресценции, свидетельствовавшее о происшедшем комплексообразовании ферментов (рис. 3, б). 10-кратное разбавление этой смеси буфером позволило регистрировать понижение анизотропии флуоресценции, характерное для диссоциации комплекса, оказавшегося, однако, менее стабильным, чем комплекс ФГМ—НСЕ ($K=4,7 \cdot 10^{-4}$ М). О реальности существования подобного взаимодействия в дрожжевой клетке можно судить лишь при проведении дальнейших специальных исследований.

В экспериментах с добавлением к меченой ФИТЦ ФГМ изоферментов енoлазы наблюдалось проявление аналогичной закономерности.

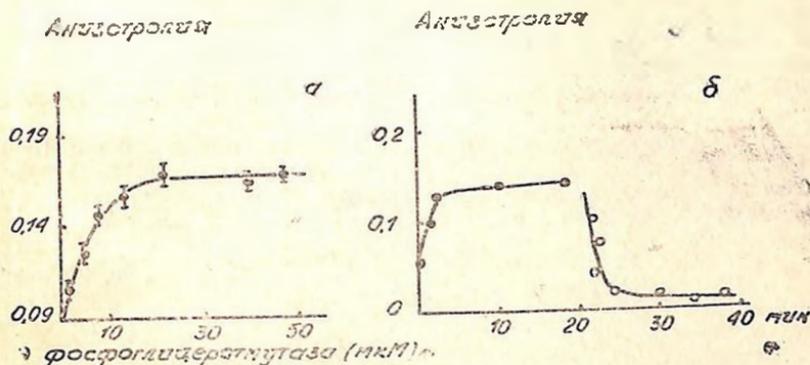


Рис. 3. а — Титрование меченой ФИТЦ дрожжевой енoлазы ФГМ.
б — Анизотропия флуоресценции образования и диссоциации комплекса дрожжевая енoлаза-ФГМ

Результаты проведенных наблюдений *in vitro* позволяют предположить об их важном физиологическом значении, что может проявиться *in vivo* в более отчетливой форме при наличии в исследуемых биологических системах высокой общей концентрации белка, ограниченного количества свободной воды и, конечно же, организующей роли элементов внутриклеточной структуры, имеющих регуляторное значение.

Следует заметить также, что настоящее исследование в известной степени раскрывает новые представления физиологического значения фактора ферментного комплексообразования в реакциях гликолиза, что может получить особое звучание в понимании метаболических путей регуляции этого важнейшего мозгового процесса.

INTERACTION OF BRAIN PHOSPHOGLYCERATE MUTASE WITH THE ENOLASE ISOZYMES

KARAPETIAN N. G.

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

The method of fluorescence anisotropy showed complex formation between the phosphoglycerate mutase and the neurospecific enolase— $\gamma\gamma$. K_d of the complex is $4 \cdot 10^{-5}$ M. The interaction is specific, because the same complexes have not been determined in the experiments with the phosphoglycerate mutase and the liver $\alpha\alpha$ or the muscle $\beta\beta$ enolases.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Ovadi J., Keleti T.* Eur. J. Biochem., v. 85, p. 157—161, 1978.
2. *Mc Gregor J. S., Singh V. N., Davoust S., Melloni E., Potremoli S., Horecker B. L.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 77, p. 3389—3392, 1980.
3. *Kochetov G. A., Niklushkina L. I., Chernov N. N.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 40, p. 873—879, 1970.
4. *Ovadi J., et al.* Eur. J. Biochem., v. 90, p. 499—503, 1978.
5. *Назарян К. Б., Егорян Р. У., Казарян Б. А.* Нейрохимия, т. 7, № 4, с. 566—573, 1983.
6. *Назарян К. Б., Карапетян Н. Г., Казарян Б. А.* Нейрохимия, т. 4, № 4, с. 410—414, 1985.
7. *Laztali U. K.* Na uce, v. 227, № 5259, p. 680—685, 1970.
8. *Tompa P., Var J., H., Vatke J.* Eur. J. Biochem., v. 159, p. 117—124, 1986.

Поступила 18. VII. 1991

УДК 612.017+577.158.2

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИИ *BRYONIA ALBA* L.
И ЖЕНЬШЕНЯ НА МИКРОСОМНОЕ ПЕРЕКИСНОЕ ОКИСЛЕНИЕ
ЛИПИДОВ ПРИ ИММОБИЛИЗАЦИОННОМ СТРЕССЕ

МАНУКЯН Ш. Р., АПРИКЯН Г. В.

Институт биохимии им. Г. Х. Буятыана НАН РА, Ереван

Изучение вопросов, связанных с регуляцией стрессов, имеет непосредственное значение для поиска лекарств, обладающих широким спектром биологического действия. Веками в народной медицине использовались стимуляторы растительного происхождения, так называемые адаптогены, которые способствуют повышению неспецифической сопротивляемости организма к внешним воздействиям и оказывают стимулирующее и тонизирующее действие.

К числу наиболее эффективных средств, повышающих резистентность организма, принадлежат адаптогены, в частности женьшень, элеутерококк и другие. При изучении механизма действия адаптогенов выявлено, что их защитные свойства проявляются только на фоне тех или иных нагрузок на организм.

Обнаружено возрастание под их влиянием умственной и увеличение физической работоспособности. Указанные сдвиги резистентности организма известны достаточно давно, они же и определили основную характеристику этих средств [1].

Исходя из сходства фармакологической активности *Bryonia alba* (Переступия белого) с женьшенем, элеутерококком и другими стимуляторами растительного происхождения, проводили соответствующие исследования для выявления способности *Bryonia alba* предупреждать и устранять отрицательные проявления различных стрессорных воздействий [2].

Общезвестно, что при стрессовых состояниях повышается уровень токсичных продуктов ПОЛ. При иммобилизационном стрессе дигликозид кукурбитамина, выделенный из корней *Bryonia alba* в значительной степени снижает уровень ПОЛ, тем самым оказывая антистрессорное действие [3]. Наши результаты показали, что при экспериментальном стрессе, вызванном карнесогенной-пародонтогенной диетой и введением преднизолона, значительно повышается ПОЛ. При длительном *per os* применении экстракта *Bryonia alba* значительно снижается уровень ПОЛ и повышается активность супероксиддисмутазы

(СОД), таким образом усиливая нейтрализацию образовавшихся перекисей [4]. Также получены результаты относительно действия препарата из *Bryonia alba* при старении. Интересно отметить, что экстракт оказывал схожее антистрессорное действие как в молодом, так и в старческом возрасте [5].

В настоящей работе представлены данные о сравнительном изучении влияния экстрактов *Bryonia alba* и женьшеня на ПОЛ в микросомальной фракции при иммобилизационном стрессе. Работу проводили на крысах линии *Wistar*. Животных подвергали 2,5-часовому иммобилизационному стрессу, после чего декапитуировали и получали микросомные фракции. Количество продуктов ПОЛ выражали в наномолях малонового диальдегида на мг белка [6]. Белок определяли по *Lowry* [7]. Активность СОД определяли по ингибированию генерации супероксидных анионов в модельной системе феназинометосульфат-NADPH нитротетразолий [8]. Экстракты *Bryonia alba* и женьшеня добавляли к инкубационной среде в количестве 10 мг/мл.

Проведенные исследования показали, что после иммобилизационного стресса значительно повышается уровень ПОЛ в микросомной фракции мозга. Повышение составляет 27,9% при аскорбатзависимом и 22,9% при NADPH-зависимом ПОЛ (табл. 1). На фоне стресса экстракты *Bryonia alba* и женьшеня значительно снижают уровень обоих процессов ПОЛ. В случае с *Bryonia alba* на 27,7%—аскорбатзависимое и 35,9%—NADPH-зависимое, а женьшень снижает аскорбатзависимое на 47,3% и NADPH-зависимое ПОЛ на 9,2%. Таким образом, экстракт *Bryonia alba* сильнее действует на ферментативное (NADPH-зависимое), а женьшень — на неферментативное (аскорбатзависимое) ПОЛ. Как и следовало ожидать, ни *Bryonia alba*, ни женьшень не оказали существенного влияния на контрольных животных. В микросомах печени картина действий оказывается схожей, но чувствительность к стрессу не высока. *Bryonia alba* также сильнее действует при ферментативном, а женьшень — при неферментативном ПОЛ.

Исследования активности СОД показали, что *Bryonia alba* и женьшень незначительно действуют на ферментативную активность в мозгу у контрольных животных, а в печени их влияния более значительны (таблица 2). После 2,5-часового стресса в мозгу активность СОД снижается на 11,3%, а в печени возрастает на 20,5%. При применении экстрактов *Bryonia alba* и женьшеня в мозгу пониженный уровень СОД достигает нормальных величин. В печени же активность СОД под влиянием отмеченных экстрактов повышается гораздо значительнонее.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что под влиянием двух адаптогенов — *Bryonia alba* и женьшеня на фоне экспериментального стресса значительно снижается уровень токсичных продуктов ПОЛ и повышается активность защитного фермента организма — СОД. Полученные нами результаты указывают на то, что препарат из корней *Bryonia alba* может с успехом использоваться в качестве антистрессорного средства при патологических состояниях.

Таблица 1
Влияние экстрактов *Bryonia alba* и женьшеня на перекисное окисление липидов в микросомной фракции белых крыс при иммобилизационном стрессе (нмоль малонового диальдегида/мг белка)

Перекисное окисление липидов		Контроль	Контроль + В. alba	Контроль + женьшень	Стресс	Стресс + В. alba	Стресс + женьшень
Мозг	Аскорбат- зависимое	27,9 ±0,49	27,2 ±0,61 $p_1 > 0,1$	23,7 ±0,92 $p_1 > 0,1$	35,7 ±0,63 $p_3 < 0,01$	25,8 ±0,32 $p_1 < 0,001$	18,8 ±0,61 $p_1 < 0,001$
	NADPH- зависимое	23,1 ±0,17	23,9 ±1,03 $p_1 > 0,1$	25,2 ±0,32 $p_2 < 0,005$	28,4 ±0,29 $p_3 < 0,01$	18,2 ±0,29 $p_4 < 0,001$	25,8 ±0,32 $p_1 < 0,05$
Печень	Аскорбат- зависимое	37,5 ±1,02	39,6 ±0,75 $p_1 > 0,1$	40,2 ±0,92 $p_2 > 0,1$	42,5 ±1,17 $p_3 < 0,05$	36,4 ±1,24 $p_1 < 0,025$	26,5 ±1,86 $p_1 < 0,05$
	NADPH- зависимое	41,1 ±0,32	43,1 ±0,92 $p_1 > 0,1$	39,7 ±0,75 $p_1 > 0,1$	46,2 ±0,63 $p_1 < 0,01$	36,1 ±1,24 $p_1 < 0,005$	42,0 ±1,245 $p_1 < 0,02$

Примечание. Здесь и в табл. 2 p_1 , p_2 , p_3 — по сравнению с контролем, p_4 , p_5 — по сравнению со стрессом

Влияние экстрактов *Bryonia alba* и женьшеня на активность супероксиддисмутазы при иммобилизационном стрессе у белых крыс

Активность (единица/мг белка)	Контроль	Контроль + <i>B. alba</i>	Контроль + женьшень	Стресс	Стресс + <i>B. alba</i>	Стресс + женьшень
Мозг	93,4 ±1,03	94,3 ±0,66 $p_1 > 0,1$	85,1 ±1,75 $p_2 < 0,005$	82,8 ±0,53 $p_3 < 0,001$	94,8 ±0,65 $p_4 < 0,001$	92,1 ±1,03 $p_5 < 0,001$
Печень	47,9 ±1,87	34,9 ±1,16 $p_1 < 0,001$	29,6 ±0,81 $p_2 < 0,001$	57,7 ±1,52 $p_3 < 0,005$	80,3 ±1,24 $p_4 < 0,001$	89,7 ±1,19 $p_5 < 0,001$

COMPARATIVE INVESTIGATION OF INFLUENCES OF BRYONIA ALBA AND GINSENG ON LIPID PEROXIDATION DURING THE IMMOBILIZATION STRESS

MANUKIAN SH. R., APRIKIAN G. V.

N. Kh. Buntatian Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci. of Rep. Armenia, Yerevan

It was shown that preparations from *Bryonia alba* and ginseng have antistress properties. They significantly decreased high levels of lipid peroxidation toxic products after 2,5 h of immobilization stress and increased the activity of protective enzyme—superoxide dismutase. A possible „prooxidant“ role of both preparations in pathological situations is discussed.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Яременко К. В. Адаптогены как средства профилактической медицины, Томск, с. 8, 1990.
2. Самвелян В. М., Пашинян С. А., Казарян А. С. Лештак белый, Ереван, с. 68, 1989.
3. Дадян М. А. Канд. дисс. Ереван, 1987.
4. Карагезян Т. А., Манукян Ш. Р., Априкян Г. В. Биол. журн. Армении, 1992. (в печати).
5. Манукян Ш. Р., Априкян Г. В. Биол. журн. Армении, 1992 (в печати).
6. Владимиров Ю. А., Арчаков А. И., Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., Наука, 1972.
7. Lowry O., H., Rosebrough N. Y. et al. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
8. Nishikimi M., Rao N. A., Yagi K. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 46, № 2, p. 849—853, 1972.

Поступила 15, IX, 1992.

УДК 615.361:612.8—611.73

РОЛЬ ТИМОЗИНОВ В НЕРВНОЙ И МЫШЕЧНОЙ ТКАНИ

ГАЛЮЯН А. А.

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

Более четверти века известны первичные структуры гормонов иммунной системы, и в частности семьи тимозинов (α , β , γ -групп), являющихся стимуляторами созревания Т-лимфоцитов—основных клеточных элементов иммунной системы.

Различные тимозины были изолированы из многих видов животных, начиная от морского ежа до млекопитающих, однако их общепризнанное значение и молекулярные механизмы еще не выяснены. Известно лишь, что тимозин β_4 стимулирует активность терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы, ингибирующей миграцию перитонеальных макрофагов как *in vitro*, так и *in vivo*, а также секрецию люлиберина и вызывает фенотипические изменения Molt-4 лейкемических клеток.

Открытие С-модулина 3 в гипоталамусе (тимозин β_4 1—39), активирующего Ca^{2+} -кальмодулинзависимые ферменты без участия Ca^{2+} и кальмодулина, в частности киназу легкой цепи миозина и сАМРФДЭ мозга, в концентрации 10^{-9} — 10^{-12} М, проливает свет на наиболее общие фундаментальные свойства тимозинов β - и α -группы на метаболизм клетки.

Полученные данные свидетельствуют о том, что тимозины, в частности β -группы (Т β_4 , Т β_4 1—39, Т α_1) являются уникальными внутриклеточными регуляторами активности кальмодулинзависимых ферментов, принимающих участие в процессах фосфорилирования и дефосфорилирования белков и ферментов в цикле сокращения и релаксации гладких мышц, полимеризации и деполимеризации актина, во многих физиологических процессах мозга и т. д.

1. Структура и фракция тимозинов

Тимозины впервые были выделены в 1975 г. из тимуса животных и человека в лаборатории Goldstein [1] как полипептиды с регуляторными свойствами в отношении активности Т-лимфоцитов, включая Т-Helper и Т-Suppressor. Ноорег и соавт. [1] обнаружили во фракции 5 пептидных подфракций, выдерживающих обработку при 80° и оказывающих регулирующее влияние на иммунные системы организма. В

полипептида дополнительно дипептида Ala-Lys-OH. Т_{β₁}-подобные пептиды (вероятно, и другие) были обнаружены у илекопитающих [14, 15]. В частности, в мозгу крупного рогатого скота нами открыт Т_{β₁} (1—39)), свидетельствующий о наличии ряда структурных аналогов Т_{β₁} (табл. 1).

Таблица 1
Аминокислотная последовательность тимозина β₁ и тимозина β₁-подобных пептидов

Тимозин β ₁	5 SDK PDM A E I E K F D K S K L K K T E T Q E K N P L P S	11 K E T I E Q E K Q A G E S	30 39	43
Т _{β₁} (1—39)	С-модули 3			39
β ₁ ^{Ala} блокированный	A			43
β ₉ ацетил	A	I G NS A	T T S E I S	41
β ₁₀ блокированный	A	G C A S A	T T S E I S	42
β ₁₀ блокированный	R	G A S A	T T R S E T S	43

Примечание. Показаны только те тимозин β₁-подобные пептиды, которые отличаются по аминокислотной последовательности тимозина.

Таким образом, первичная структура Т_{β₁} отличается от таковой Т_{β₉} и Т_{β₁₀} по следующим показателям: N-концевыми аминокислотами в первом положении Т_{β₁}, Т_{β₉} и Т_{β₁₀} являются Ser, Ala, Ala соответственно, в 7-м—Ala, Gly, а в 10-м Glu, Asn. В положении же 6 Т_{β₁} и Т_{β₁₀} содержит Met вместо Leu в структуре Т_{β₁}. Т_{β₁} и Т_{β₉} были выделены из тимуса теленка, а Т_{β₁}^{Ala} и Т_{β₁₀}^{Ala} из селезенки кролика.

Все β₁-подобные пептиды, за исключением Т_{β₉}, в котором отсутствует Met-остаток, содержат один метионинный остаток; не исключено, что в условиях *in vivo* может существовать и сульфоксидная форма пептида. Изучение Т_{β₁} в 9 различных тканях возрастных групп белых крыс [13] позволило выявить наибольшую степень его концентрации—733 мкг/г в селезенке и наименьшую в мышце—6—9 мкг/г (табл. 2).

Таблица 2
Концентрация Т_{β₁} в различных тканях мкг/г ткани у крыс 6-, 60- и 200-дневного возраста

Ткань	Возраст (дни)		
	6	60	200
Селезенка	195±7	452±14	733±36
Тимус	153±12	285±36	
Семенник	208±9	49,2±4,2	44,0±3,1
Легкие	169±11	116±7	202±10
Почки	136±10	597±4,7	81,6±4,2
Мозг	111±7	82,5±2,7	65,8±5,7
Печень	81,7±5,6	86,7±4,0	108±8
Сердца	39,7±4,2	28,5±2,7	25,2±1,1
Мышца	20,2±2,6	11,1±0,7	6,9±0,9

Как видно из табл. 2, содержание иммунореактивного Т β_4 , находящегося в телах клеток галактоцеребропозитивных олигодентроцитов вокруг миелиновой оболочки мозга составляет в мозгу 6-, 60- и 200-дневных крыс 111, 82 и 65 мкг/г ткани соответственно; Т β_4 принимает важное участие в процессах регуляции иммунных процессов, демиелинизации, вызванной активацией антигенактивируемых макрофагов [25]. Миелин, тела нейронов, аксоны и астроциты не реагируют с антитимозином β_4 .

Окрашивание Т β_4 -позитивных олигодентроцитов происходит в цитоплазме и это совпадает с окраской основного белка миелина—олигодентроцитов мозга новорожденных. Накоплен значительный материал, свидетельствующий о двусторонних связях ЦНС и иммунной системы. Опиоидные пептиды, АКТГ, Т β_5 фракции и др., продуцируемые лимфоцитами, могут функционировать в иммуномодуляторных нейроэндокринных процессах.

Т α_1 и Т β_4 , лимфокины, аналог АКТГ, Т β_5 и β -эндорфины, интерлейкин 1, интерферон, как и другие лимфокинины и цитокинины, являются иммуотрансмиттерами, синтезирующимися преимущественно клетками иммунной системы и превращающими специфические сигналы и информацию к нейронам и другим типам клеток.

Доказательством того, что определенные тимозиновые пептиды могут служить иммуотрансмиттерами, являются данные об их участии в модулировании гипоталамо-гипофизарной-адреналовой системы [26]. Т β_4 , но не Т α_1 , оказывает стимулирующее воздействие на процесс секреции LH-RH из медио-базального гипоталамуса крыс [27]. Это свидетельствует о потенциальной роли пептидов тимуса (а по нашим данным, и гипоталамуса) в ренеративной функции. Наличие Т β_{10} продемонстрировано и в развивающемся человеческом мозгу с очевидным участием ретиноловой кислоты как регулятора активности человеческого Т β_{10} в нейробластоме [28]. Имеются указания о влиянии тимозина и β -актинина на латерализацию сенсомоторного контроля у крыс [29] и локализации Т α_1 [30] в астроцитах человеческого мозга. Присутствие Т β_4 [31] установлено в нормальном человеческом мозгу, лимфоидных клетках и в олигодентронитах. Его взаимоотношение с нейроэндокринной системой показано Hall и Goldstein [32], причем человеческий эмбриональный мозг экспрессирует высокие уровни полипептидов, идентифицированных методами белковой биохимии и клонированием Т β_{10} . Спустя 18 месяцев после рождения в человеческом мозгу отмечается падение содержания Т β_{10} до неопределенного уровня, что объясняется атакой гена Т β_{10} в развивающемся мозгу. В развивающемся мозгу новорожденных уровень протимозина α и РНК приблизительно в 8 раз превосходит его содержание в зрелом мозгу [33]. Тем не менее до сих пор остаются не выделенными и не охарактеризованными тимозины из мозга различных животных и человека. Имеющиеся в литературе сведения касаются радиоиммунохимически опре-

данных форм тимозина, главным образом, α_1 и β_4 в олигодентроцитах. С другой стороны, информация относительно тимозинов в гипоталамусе и, особенно $T\beta_4$, полностью отсутствует, хотя имеются данные, что [29] под влиянием тимозина обнаруживаются определенные изменения активности вентромедиальной области гипоталамуса.

Участие нейроэндокринной системы, и, главным образом, нейропептидов, в регуляции иммунной системы не вызывает сомнений, регуляция этого сложного процесса осуществляется как на уровне тимуса, где в основном образуются различные тимозины, так и макрофагов (β -клеток, селезенки, лимфоидных узлов и т. д.), где происходит биосинтез интерлейкина—1, $T\beta_4$ и др. ингибиторов или стимуляторов цитокининов и прочих факторов. Несмотря на это, роль тимозинов в самой ИС пока во многом остается невыясненной.

В литературе накоплен значительный материал, свидетельствующий о нейроэндокринной функции тимуса [34], клетки которого, согласно эмбриологическим исследованиям, являются образованиями эктодермального происхождения, образующимися из нервного креста и мигрирующими в примитивный эктодермальный рудимент этого органа. Они принимают участие, главным образом, в формировании мезенхимы тимуса, эпителиальная часть которого также образуется из нервного креста [35]. По данным Green и соавт. [34], человеческий тимус является местом синтеза в большом количестве вазопрессина и окситоцина, обладающих интерлейкин-2-подобными свойствами, а в эквивалентных количествах—нейрофиззинов, являющихся их предшественниками. Стало известно количество иРНК для этих полипептидов в самом тимусе. Активированные лимфоциты способны продуцировать АКТГ, β -эндорфин и другие активные соединения. Анатомическая связь тимуса с центральными структурами осуществляется посредством парасимпатических волокон, берущих свое начало из ядер вагуса и заканчивающихся в стволе мозга, а также симпатических волокон, идущих из г. Stellatum и других ганглиев в грудной цепи.

Подобно другим нейросекреторным клеткам, нейроэндокринные клетки тимуса трансформируют нервный импульс в секрецию нейропептидов, действующих на дифференциацию или пролиферацию Т-лимфоцитов и модулирующих образование лимфокининов типа γ -интерферона, или гормонов, подобных АКТГ и β -эндорфину, принимая таким образом важное участие в формировании адаптационной функции организма. Основные функциональные назначения иммунной системы в значительной степени обуславливаются согласованными эффектами В-клеток (продуцирующих антитела) и Т-клеток.

Последние дифференцируются под регулирующим влиянием эпителиальных клеток тимуса, часть которых, как уже отмечалось, имеет нервное происхождение и действует или прямо (как цитотоксические Т-лимфоциты), или опосредованно через растворимые факторы, известные как лимфокинины, являющиеся медиаторами, активирующими различные типы клеток, в частности моноциты и макрофаги, осуществляя взаимодействие между ними. Коммуникация между лейкоцитами

реализуется посредством интерлейкинов при активном включении в эти процессы дифференциации Т-клеток эпителия тимуса, а также участие нескольких гормонов, в том числе тимостина и тимуллина. Первый из них является пептидом с 49-ю аминокислотными остатками, 5 из которых обладают наибольшей степенью активности. Вторым принадлежит к металлопептидам с 9-ю аминокислотными остатками, реализующими процесс нейрональной дифференциации [36].

Центральная роль пептидов в нервах, нейроэндокринных клетках и нейронах, а также в модуляции гематологических и иммунологических функций показана как в опытах *in vitro* на модельных экспериментальных животных, так и у людей [37]. Механизм действия нейропептидов на лейкоциты осуществляется как прямым, так и косвенным путем через выделение иммуоактивных медиаторов и других эффекторов, вызванных неиммунными клетками. Наличие пептидергических нервных волокон и нейроэндокринных клеток в лимфоидной ткани, связанной с мукозой, свидетельствует о потенциальных структурных связях между нервной и иммунной системами [38—40], о чем, в частности, говорит факт обнаружения рецепторов определенных нейропептидов в различных типах иммунных клеток [41]. Примечательно установление присутствия большого количества транскрипта $T\beta_4$ в отделах мозга, лишенных лимфоцитов. В кишечнике же, содержащем незначительное количество этих элементов крови, наоборот, регистрируется низкий уровень $T\beta_4$ и иРНК. Наконец, $T\beta_4$ синтезируется в миобластах и фибробластах [16].

Тимозины как новый класс активаторов Ca^{2+} -кальмодулин-зависимых ферментов

Некоторые коронаросуживающие полипептиды, выделенные нами из гипоталамуса, в частности С-модулины (СМ), выступают в качестве стимуляторов базальной активности ряда кальмодулин (КМ)-зависимых ферментов, таких как ФДЭ сАМР, киназа легкой цепи миозина (КЛЦМ), КМ-зависимая протеникиназа, фосфорилаза киназы. Имеется определенное сходство между стимулирующими эффектами С-модулина и КМ с той разницей, что для активирующего действия СМ на деятельность ферментов не требуется участия Ca^{2+} и КМ с отмеченной целью. Нами разработан метод очистки СМ из состава низкомолекулярных соединений гипоталамуса [42] и достигнута расшифровка первичной структуры одного из СМ [43]. Показана идентичность этого вещества с М, 4618,96 Д с $T\beta_4$ (1—39). Было предпринято изучение эффекта нативного СМ-3 на активность КЛЦМ скелетной мышцы в сравнении с влиянием $T\alpha_1$ и фрагмента β_4 (16—38). Согласно полученным результатам, все они оказались Ca^{2+} -независимыми мощными стимуляторами КЛЦМ, причем наибольшей активностью обладает нативный СМ, затем в нисходящей последовательности фрагмент $T\beta_4$ (16—38), $КМ + Ca^{2+} > T\alpha_1$. Активирующие концентрации для СМ-3, $T\beta_4$ (16—38), а также $КМ + Ca^{2+}$ составляют 10^{-12} М, а $T\alpha_1$ — 10^{-9} М.

Несмотря на существование определенной научной информации относительно Ca^{2+} -зависимого взаимодействия КМ с пептидами и ферментами-мишенями, его физиологическое значение остается пока мало изученным. Возникает вопрос: является ли КМ единственным белковым регулятором активности ряда ферментов, катализирующих реакции тканевого метаболизма у эукариот, включая процессы мышечного сокращения, деление клеток, обмен циклических нуклеотидов и гликогена, сопровождающиеся изменениями внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . В связи с этим нами установлено наличие новой группы пептидов в виде Ca^{2+} -независимых регуляторов КМ-зависимых ферментов. Эффект их влияния оказывается качественно отличающимся от характера действия некоторых фосфолипидов, жирных кислот и пептидов, не требующих присутствия Ca^{2+} для проявления своего влияния на активность фермента. Проведенные наблюдения склоняют нас к мысли о причастности СМ к системе универсальных Ca^{2+} -независимых регуляторов активности ферментов. Раскрытие их первичной структуры дает возможность пересмотра механизмов регуляции КМ-зависимых ферментов, свидетельствуя тем самым о существовании нового уровня регуляции активности ферментов. Методы выделения СМ, миозина, определения активности КЛЦМ и КМ в последнее время нашли свое достаточно обстоятельное описание [43—48]. Нами было показано существование в гипоталамусе трех основных пептидов: Ca^{2+} , КМ-независимых активаторов КМ-зависимых ферментов (СМ), названных соответственно С₁, С₂ и С₃ (рис. 1) и после рехроматографии последней фракции было получено индивидуальное вещество, подвергнутое секвенированию (рис. 2). Как выясняется, СМ-3 лишен свободной NH_2 -группы, а методом лазерного масс-спектрального анализа установлена его величина M_r , равная 46189 Д. Изучение аминокислотного состава кислотного гидролизата СМ, согласно данным табл. 3, позволило обнаружить в нем присутствие 9 остатков лизина, а также 10 остатков: Glx, Glu и Gln, что, на наш взгляд, является величиной достаточно значительной. Вместе с тем, удалось доказать полное отсутствие в гидролизате валина, чем и обусловлено отличие R-1 от R-2 (СМ-3), а также гистидина, триптофана, аргинина и тирозина. Для определения аминокислотной последовательности белка с закрытым концом и получения пептидной карты был проведен частичный трипсиновый гидролиз, не давший однако желаемого результата. В связи с этим мы предпочли прибегнуть к протеолизу с помощью эндолизина С, вызывающего избирательное расщепление субстрата в местах локализации остатков лизина.

После гидролиза эндолизином С из СМ-3 фракции имеет место образование приблизительно 14 фрагментов. Под влиянием эндолизина С образуется ряд пептидных фрагментов, в том числе, как и следовало ожидать, и полипептида, N-конец которого был заблокирован ацетилированием. Некоторые из них были нами идентифицированы при использовании методов масс-спектрального анализа и микросеквенирования.

Как было отмечено, удалось разделить 14 пептидов после протолиза эндוליзином С. Благодаря электронному масс-спектральному анализу удалось показать величины M_r интактного полипептида (СМ-3), а также его фрагментов, в том числе 1 и 8 фракций (табл. 4). Наиболее интенсивный пик, полученный хроматографически с M_r , равной 13029 Д (рис. 1), соответствует I—II участкам тимозина со следующей структурой:

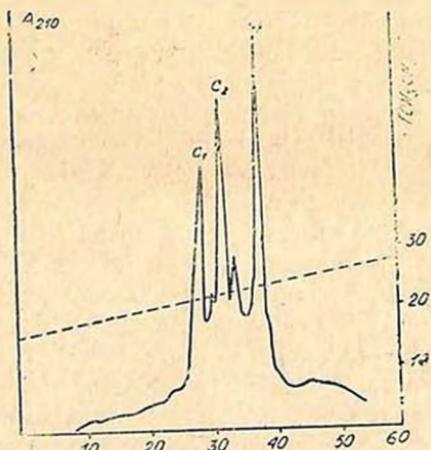
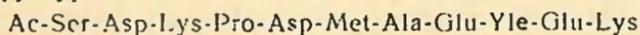


Рис. 1. Очистка С-модулинов ВЭЖХ фракции из II пика лиофилизирована, остаток растворяли в буфере А и проводили обращенно-фазовую ВЭЖХ. Элюция градиентная

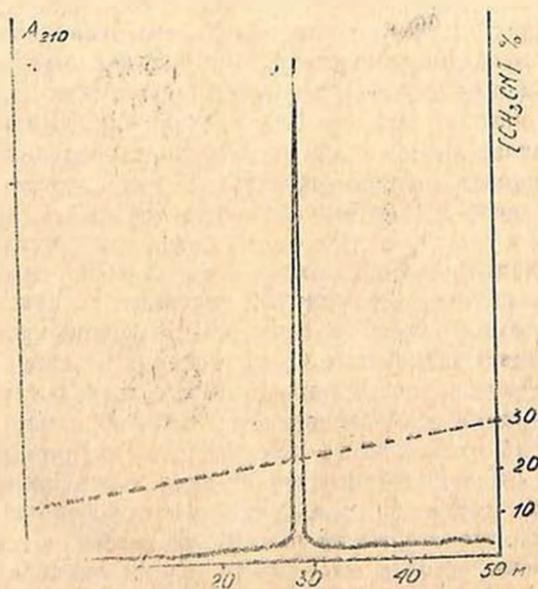


Рис. 2. Рехроматография C_3 на обращенно-фазовой ВЭЖХ

Он не подвергается секвенированию из-за ацетилированности N-конца. Что касается второго пика с M_r 654,8 Д, то, по нашим данным, он соответствует участку 26—31 Т β_4 .

Таблица 3
Аминокислотный анализ С-модулина 3

Аминокислота	иономоль	Теоретический для Т β_4 (1—39)
Asx	4,1	4
Thr	2—8	3
Ser	3,2	3
Glx	9,3	10
Pro	3,0	3
Gly	1,9	0
Ala	1,9	1
Val	0—0	0
Met	0—6	1
Ile	1,8	2
Leu	2,3	2
Tyr	0,2	0
Phe	1,1	1
His	0,4	0
Lys	7,7	9
Trp	0,0	0
Arg	7,0	0

По нашим данным, массы фрагментов 1 и 8 соответствуют массам, рассчитанным по аминокислотной последовательности, которую удалось определить для фрагмента с M_r 655,4 (табл. 4), секвенирование которого показано наличием пентапептида (табл. 5). Согласно компьютерным данным, эти участки находятся в Т β_4 быка. Суммируя информацию по полученным показателям (величине M_r , аминокислотному составу, пептидной карте, а также вышеуказанным участкам последовательности аминокислот), можно прийти к заключению об идентичности выделенного нами СМ-3 с Т β_4 (1—39) быка. Окончательное решение этого вопроса требовало проведения специального сравнения биологических активностей нативного СМ-3 и тимозина, для чего были использованы синтетические фрагменты Т β_4 (16—38) быка.

H_2N -Lys-Leu-Lys-Thr-Glu-Thr-Gln-Glu-Lys-Asn-Pro-Leu-Pro-Ser-Lys-Glu-Thr-Ile-Glu-Gln-Glu-Lys-OH-Lys-Asn-Pro-Leu-Pro-Ser-Lys и Т α_1 теленка.

Таблица 4
Масс-спектральные данные образца СМ-3 и его фрагментов

Образец	M_r (обнаруженная)	M_r (подсчитанная)	Структура
Интактный СМ-3	4618,9 Д	4619,2 Д	Т β_4 (1—39)
Фрагмент 1	1303,9 Д	1304,6 Д	Т β_4 (1—11)
Фрагмент 8	655,8 Д	655,4 Д	Т β_4 (26—31)

Примечание. Образцы были секвенированы на газо-фазном микроанализаторе, сконструированном в City of Hope (США) [49] и приспособленном к проточному реактору [50]. Фенилтиогидантроны аминокислоты анализированы на обратной фазе ВЖЭХ, данные определяли на приборе „Perkin—Elmer LSM“ (США) [50].

Таблица 5

Эдмановское микросеквенирование пептида фрагмента 8
после деградации эндолизиним С-модулина 3

Цикл	Аминокислотный остаток	Выход (нмоль)
1	Asn	9,7
2	Pro	3,9
3	Leu	5,1
4	Pro	5,9
5	Ser	1,2

*Действие Т₃ (1—39) (нативного) фрагмента Т_β (16—33)
и α₁ на активность КЛЦМ*

Как уже отмечалось, СМ выступают в роли мощных стимуляторов ряда Са²⁺-кальмодулин-активируемых ферментов—ФДЭ сАМР, КЛЦМ, протеникиназа, фосфорилаза киназа 5 нуклеотидаза и т. д. без участия Са²⁺ и КМ. В настоящем исследовании нами изучены эффекты вышеуказанных полипептидов на КЛЦМ и ФДЭ сАМР.

Гомогенный С₃ (Т_β 1—39) как фракция, полученная ВЭЖХ, обладает мощным стимулирующим действием на КЛЦМ скелетных мышц [43].

При электрофорезе миозина (на 8 М мочевины) на 10%-ных акриламидных гелях фосфорилированные и не фосфорилированные легкие цепи миозина хорошо разделяются. КЛЦМ, элюированная через КМ-сефарозу, не обладает ферментативной активностью в отсутствие КМ и даже при наличии избытка Са²⁺, что свидетельствует об отсутствии в препаратах КЛЦМ эндогенного КМ. При этих условиях не происходит фосфорилирования ЛЦ₂. Однако наблюдалась противоположная картина при добавлении С₃, Т_β (16—38) или Та₁ в отсутствие экзогенного КМ [43] (рис. 3).

В отличие от КМ, указанные эффекты не требуют присутствия Са²⁺ для активации фермента. При добавлении в инкубационную смесь 10 М СаСl₂ или 10⁻⁴ М ЭДТА отмечалось повторение тех же результатов. При этом СМ-3 выступает в роли сильного активатора базальной активности КЛЦМ. Были использованы также синтезированные в нашей лаборатории фрагменты СМ Т_β (11—19, 25—31), фрагменты 5 и 3 лизинового остатка соответственно. Примечательно, что все употребляемые эффекты обладали в различной степени сильно стимулирующим влиянием на базальную активность этого фермента. Учитывая, что под влиянием эндолизина С происходит образование ряда пептидов, можно предположить важность значения последних в регуляции КЛЦМ, ФДЭ сАМР и т. д. Известна роль КМ, являющегося Са²⁺-связывающим рецепторным белком-активатором ряда ферментов [51, 52], однако пока не ясно, является ли он единственным белком,

наделенным универсальным свойством воздействия на активность ферментов в присутствии Ca^{2+} .

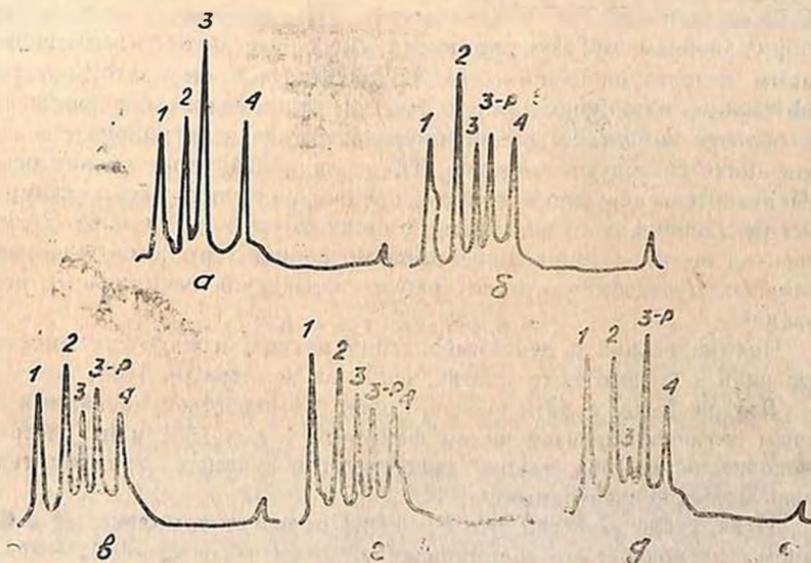


Рис. 3. Фосфорилирование ЛЦ₂ соответствующие: а) парара. Миозин инкубировали с КЛЦМ, как указано в методах, в отсутствие (а, в, г, д) или в присутствии (б) кальмодулина. Инкубационная смесь: а—без эф- фектора, в—с $\text{T}\beta_3^{16-38}$, г—с $\text{T}\alpha_1$, д—с SM_3 в концентрациях по 50 пмоль. 1—тяжелые цепи миозина скелетной мышцы, 2—щелочные легкие цепи (ЛЦ₁), 3—легкие цепи миозина (ЛЦ₂), р—фосфорилированные легкие цепи миозина (ЛЦ₂-Р), f—щелочные легкие цепи (ЛЦ₃)

СМ известны как уникальные регуляторы активности указанных ферментов в концентрации 10^{-12} М, что является весьма важным доказательством как наличия системы дубликатов Ca^{2+} -КМ системы, так и нового уровня регуляции, когда содержание Ca^{2+} оказывается совершенно недостаточным для достижения эффекта насыщения КМ.

Фундаментальность значения С-модулинов и тимозинов в обеспечении функционирования регуляторных механизмов в регуляции клеточного метаболизма

Изолирование и расшифровка первичной структуры одного из СМ— уникального аллостерического регулятора Ca^{2+} -КМ-активируемых ферментов из гипоталамуса открывает новые горизонты изучения химии и биологии заменителей Ca^{2+} -КМ системы. Идентичность СМ с $\text{T}\beta_4$ (1—39) позволяет совершенно по-новому объяснить биологические функции и молекулярные механизмы действия этих полипептидов.

Таким образом, впервые подчеркивается роль тимозинов в сокращении гладкой мускулатуры, а также в активации Ca^{2+} -КМ-зависимы-

ми ферментами без участия КМ. Saifer и соавт. [53] был выделен и идентифицирован фактор, предотвращающий полимеризацию G-актина человеческих тромбоцитов. Очищенный $T\beta_4$ связывается стехиометрически G-актином, образуя комплекс, способный быть идентифицированным неденатурированным ПААГ электрофорезом. Авторы установили полную идентичность F_x с $T\beta_4$. $T\beta_4$ функционально эквивалентен F_x , образуя комплекс 1:1 с мономерами актина и ингибируя его полимеризацию. По мнению авторов, $T\beta_4$, по крайней мере, служит основным активсеквенирующим белком, предположительно вызывающим эффект релаксации, хотя и в наших опытах *in vitro* и *in vivo* этот полипептид вызывал сокращение гладкой мускулатуры, выяснение молекулярных механизмов которого требует проведения специальных исследований.

Полимеризация и деполимеризация актина играют фундаментальную роль в подвижности клетки, включая хемотоксин [54].

Другой белок с антисеквенирующей активностью, названный мозговым актинполимеризирующим фактором у кур [55] или дестрин у млекопитающих [56], также существует в куриных тромбоцитах в очень малых концентрациях.

Итак, стало известно, что F_x [$T\beta_4$] образует комплекс 1:1 с G-актином и ингибирует его полимеризацию.

По-видимому, при низкой концентрации ионов кальция происходит переключение Ca^{2+} -КМ пути регуляции активности кальмодулин-активируемых ферментов на С-модулиновый.

Учеными, открывшими и изучавшими химию и биологию тимозина опубликован ряд обзорных статей [57—72]. Задачей настоящего обзора было привлечь внимание к новым функциям и фундаментальным механизмам действия тимозина на кальмодулин-активируемые ферменты мозга и гладкой мускулатуры.

ROLE OF THYMOSIN IN NERVE AND MUSCLE TISSUE

GALOYAN A. A.

H. Kh. Buniatian Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci. of Rep. Armenia, Yerevan

It is more than for a quarter of century the primary structures of hormones of immune system are known, namely of thymosins family (α , β , γ -groups), which are stimulators of T-lymphocytes maturation—the main cellular elements of immune system.

Different thymosins were isolated from numerous kinds of animals, beginning from sea-urchin to mammals, nevertheless their general biological significance and molecular mechanisms are not known yet. It is known only that thymosin β_1 stimulates the activity of deoxynucleotidyl transferase inhibiting the migration of peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo*, as well as the secretion of lutealberine and induces phenotypical changes of Molt—4 leucemic cell.

Discovery of C-modulin 3 in the hypothalamus ($T\beta_1^{1-39}$) (which activates Ca^{2+} -calmodulin-dependent enzymes without Ca^{2+} and calmodulin participation, namely MLCK and cAMP PDE of brain in concentration 10^{-9} — 10^{-12} M) illuminates more general fundamental properties of $T\beta$ and $T\alpha$ groups for cell metabolism.

The results obtained testify, that thymosins, namely β -groups ($T\beta_1$, $T\beta_1^{1-39}$, $T\alpha_1$), are unique intracellular regulators of calmodulin-dependent enzymes activity, participating in the processes of phosphorylation and dephosphorylation of proteins and enzymes in the cycle of contraction and relaxation of smooth muscles, polymerization and depolymerization of actin in many physiological processes of brain, etc.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hooper J. A., McDaniel M. C., Thurman G. B., Cohen G. H., Schulof R. S., Goldstein A. L. Ann. of New York Academy of Sci., v. 249. p. 125—144, 1975.
2. Spangelo B. L., Hall N. R., Goldstein A. L. Ann. of New York Academy of Sci. v. 496, p. 196—204, 1987.
3. Goldstein A. L., Low T. L. K., Matdoo M., McClure J., Thurman G. B., Rosstio N., Lai C.—Y., Meinhoffer N. PNAS USA, v. 74, p. 725—729, 1977.
4. Low T. L. K., Goldstein A. L. J. Biol. Chem., v. 254. № 3, p. 987—995, 1979.
5. Low T. L. K., Hu S. K., Goldstein A. L. PNAS USA, v. 78, p. 1162—1166, 1981.
6. Naylor P. H., McClure J. E., Spangelo B. L., Low T. L. K., Goldstein A. L. Immunopharmacology, 7:9, 1984.
7. Hannappel E., Davous J. S., Horecker B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 79, p. 1708—1711, 1982.
8. Hannappel E., Kalbacher H., Voelter W. Arch. Biochem. Biophys., v. 260, p. 546—553, 1988.
9. Ericson-Viitanen S., Riggeri S., Natalina P., Horecker B. L. Arch. Biochem. Biophys., v. 225, p. 407—413, 1983.
10. Ericson-Viitanen S., Ruggiezi S., Natalini P., Horecker B. L. Anal. Biochem., v. 156, p. 390—399, 1983.
11. Shlessinger D. H., Goldstein G., Niall H. D. Biochemistry, v. 14, p. 2214—2218, 1975.
12. Goldstein G., Scheid M., Hammerlin U., Boyse E. A., Schlesinger D. H., Niall H. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 72, p. 11—15, 1975.
13. Hannappel E. And. Biochem., v. 134, p. 390—396, 1950.
14. Hannappel E., Leibold W. Arch. Biochem. Biophys., v. 240, № 1, p. 236—241, 1985.
15. Comez-Marquez J., Mercedes D., Segade F. The J. of Immunology, v. 143, p. 2740—2744, 1989.
16. Goodall G. J., Morgan J. I., Horecker B. L. Arch. Biochem. Biophys., v. 221, p. 598, 1983.
17. Weller F. E., Mutchnick M. G., Goldstein A. L., Naylor P. H. J. Biol. Response Mod., 7: 91, 1988.
18. Low TLK, Hu S.—K., Goldstein A. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 78, p. 1162—1166, 1981.
19. Makarova T., Grebenshikov N., Egorov C., Vartapetian A., Bogdanov A. FEBS Lett., v. 257, № 2, p. 247—250, 1989.
20. Wotts J. D., Cary P. D., Crane-Robinson C. FEBS Lett., v. 245, p. 17—20, 1989.
21. Eshenfeldt W. H., Manrow R. E., Krug M. S., Berger S. L. J. Biol. Chem. v. 264, p. 7546—7555, 1989.

22. Haritos A. A., Blacher R., Stein S., Carderella J., Harecker B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 82, p. 343-346, 1985.
23. Haritos A. A., Goodall G. J., Horecker B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 81 p. 1008-1011, 1984.
24. Wada S., Naylor P. H., Naylor C. W., Goldstein A. L. Thymus, 12 (4), p. 215-224, 1988.
25. Dalakas M. C., Trapp B. D. Ann. of Neurobiology, v. 19. № 4. p. 349-354. 1986.
26. Hall N. R., McGillic J. P., Spangelo B. L., Goldstein A. G. Immunol., v. 135, 2 suppl., p. 806-811, 1985.
27. Rebar R. W., Miyake A., Low T. L., Goldstein A. L. Science, v. 6. № 214. p. 669-671. 1981.
28. Hall A. K., Hempstad J., Morgan J. C. Mot. Brain, Res., v. 8, p. 129-135, 1990.
29. Добрынин В. П., Федин В. А., Обичаевская И. Ю., Погосова Е. П., Непринцева Е. С. Бюл. Эксперим. биол. и мед., т. 108, № 8, с. 139-142, 1989.
30. Su Y. L., Ho K. L., Dalakas M. G. Ann. Neurol., v. 26. № 2. p. 277-280, 1989.
31. Dalakas M. C., Trapp B. D. Ann. Neurology, v. 19. (4). p. 349-355, 1986.
32. Hall N. R., Goldstein A. L., Lymphokine Res., v. 2 (1), p. 1-6, 1983.
33. Dosi M., Freire M., Gomez Marquez J. FEBS Lett., v. 269, № 2. p. 373-376, 1990.
34. Green V., Legros J. J., Francimont P., Defrense M. P., Boniver J., Ivell R., Kichter D. Ann. of New York Acad. Sci., v. 496, p. 56-66, 1987.
35. Le Douarin N. M., Joufreau F. V. Exp. Med., v. 142, p. 17-40, 1975.
36. Bach J. F. Hormones of the Immune System, 1989.
37. Pert C. B., Ruff M. R., Weber R. J., Herkenmaham M. J. Immunol., v. 132, p. 1601-1604, 1984.
38. Payan D. G., Levine J. D., Goetzl E. J. J. Immunol., v. 132, p. 1601-1604, 1984.
39. Felten D. L., Felten S. Y., Carlson S. L., Olschoka J. A., Livnat S. J. Immunol. v. 135, p. 756-765, 1985.
40. Angeletti R. H., Hickey W. F. Science, v. 230, p. 89-90, 1985.
41. Wiedermann C. J. Neuroimmunomodulation. N. H. Spector (ed. Gordon and Breuch).
42. Галоян А. А., Бобрискин И. Д., Гуриц Б. Я., Абрамя Г. Э. Нейрохимия, т. 8, с. 78-86, 1989.
43. Galoyan A. A., Gurbits B. Yu., Shu. a'oya I. A., Michael T., Davic John E., Shively Terry D. Lee. Neurochem. Res., v. 17, № 8, p. 773-777, 1992.
44. Stepkowski D., Szczensien D., Wrotck A., Kakob J. Biochem. et biophys. acta, v. 831, p. 321-329, 1985.
45. Adelstein R. S., Conti M. A., Harhawy D. R., Klee C. B. J. Biochem., v. 253, p. 8347-8350, 1978.
46. Morgan M., Perry S. V., Ottoway J. Biochem. J., v. 157, p. 687-697, 1976.
47. Perrie W. T., Perry S. V. Biochem. J., v. 119, p. 31-38, 1970.
48. Gopa'akrishna R., Anderson W. B. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 104, p. 830-835, 1982.
49. Hawke D. H., Harris D. E., Schively J. E. Anal. Biochem., v. 147, p. 315-330, 1985.
50. Schively J. E., Miller P., Ronk M. Anal. Biochem., v. 163, p. 517-529, 1987.
51. Cheung W. Y. Science, v. 207, p. 19-27, 1980.
52. Klee C. B., Crouch T. H., Richman P. G. Ann. Rev. Biochem., v. 49, p. 489-515, 1980.
53. Saffer D., Elzinga M., Nachmias V. T. J. Biol. Chem., v. 266. № 7, p. 4024-4052, 1991.
54. Bamburg J. R., Bray D. J. Cell. Biol., v. 105, p. 2817-2825, 1987.
55. Nishida E. Biochemistry, v. 24, p. 1160-1164, 1986.
56. Hannappel E. J. Anal. Biochemistry, v. 156, p. 390-396, 1986.

57. Erickson-Viitanen S., Ruggieri S., Natalini P., Horecker B. L. Arch. Biochem. and Biophys., v. 221, p. 570—576, 1983.
58. Wang S. S., Wang B. S. N., Chang J. K., Low T. L. K., Goldstein A. L. Int. J. Peptide Protein Res., v. 18, p. 413—415, 1981.
59. Low T. L. K., Hu S.-K., Goldstein A. L. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 78, p. 1167—1166, 1981.
60. Voelter W., Echner H., Kalbacher H., Dinh T. Q., Kapurniotu A., Jahan M., Gräßler G., Link P., Mihelič M., Stock W.—In: Peptides, 1986, (ed. D. Theodoropoulos), Walter de Gruyter, Berlin, New York, p. 581—584, 1987.
61. Grillon G., Rieger K., Bakala J., Schoot D., Morgat J.—L., Hannappel E., Voelter W., Lenfant M. FEBS, v. 274, p. 30—34, 1990.
62. Hannappel E., Davoust S., Horecker B. L. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 79, p. 1708—1711, 1982.
63. Hartos A. A., Calderatta J., Horecker B. L. Analytical Biochem., v. 144, p. 436—440, 1985.
64. Panneerselvam C., Clinton M., Wellner D., Horecker B. L., Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 155, p. 539, 1988.
65. Goldstein A. L., Low T. L. K., McAdoo M., McClure J., Thurman G. B., Rosio J. L., Lai C. W., Chang D., Wang S. S., Harvey C., Ramel A. H., Meirhofer J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 74, p. 725, 1977.
66. Hu S. K., Low T. L. K., Goldstein A. L. Mol. Cell. Biochem. v. 41, p. 49, 1981.
67. Kouttab N., Goldstein A. L., Lu M., Campbell B., Matzel A. A. Immunopharmacol., v. 16, p. 97, 1988.
68. Voelter W., Kapurniotu A. In: Studies in Natural Products Chemistry, v. 8, (ed. Atta-ur-Rahman), Elsevier Publishers, B. V., Amsterdam, p. 433—461, 1991.
69. Voelter W., Kalbacher H., Echner H., Schmid B., Treffer U., Schröder C. Z. Naturforsch., v. 45b, p. 1725—1728, 1990.
70. Gomez-Marquez J., Segade F., Dosil M., Pichel J. G., Bustelo X. R., Freire M. J. Biol. Chem., v. 264, p. 8451, 1989.
71. Contreas C. N., Mutchnick M. G., Palmer K. C., Weller F. E., Luk G. D., Naylor P. H., Erdos M. R., Goldstein A. L., Panneerselvam C., Horecker B. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v. 87, p. 3269, 1990.
72. Galoyan A. A., Gürvits B. X., Shuvalova L. A., Davis M. T., Shively J. E., Lee T. D. Neurochemical Res., v. 7., p. 773—777, 1992.

Посрупула 15, V, 1992

ЗАМЕЧЕННЫЕ ОПЕЧАТКИ

Страница	Строка	Напечатано	Должно быть
6	1 сверху	ГАМК, чем, в частности свидетельствует	ГАМК, о чем, в частности, свидетельствует
66	9 снизу	профильтрированного	профильтрированного
67	15 снизу	видно как белки...	видны как белки..
102	1 сверху	аденилиамидодифосфат	аденилилмидодифосфат
106	6 снизу	АЦ в провенозных капил- лярах	АЦ в кровеносных капи- лярах
110	6 сверху	о меченными	с меченными

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

Объем рукописи (включая резюме, список литературы и иллюстрации) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзоров не должен превышать 20 с., кратких сообщений, рецензий и хроника—4 с., а писем в редакцию—2 с.

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

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

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

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

4. Рисунки, отчетливо выполненные тушью на плотной белой бумаге или кальке, представляются в конверте в двух фотографиях и трех экземплярах. На обороте каждого рисунка карандашом следует указать фамилию автора, сокращенное название статьи и порядковый номер. Для фотографий (на глянцевой бумаге) следует указать ее верх и низ. Подписи к рисункам и фотографиям представляются на отдельном листе. Замена фотоиллюстраций электрофоретических исследований рисованными схемами не допускается. Количество иллюстраций и рисунков не должно превышать в статьях 2, в кратких сообщениях—1.

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

Фамилии иностранных авторов даются в тексте на языке оригинала.

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

СОДЕРЖАНИЕ

<i>Розанов В. А., Герасимьяк Г. Р., Шофран Л. М.</i> Влияние бис(н-трибутил.олово) оксида на N ⁺ -зависимое поглощение L[¹⁴ C] ГАМК срезами коры головного мозга крыс	3
<i>Бояджян А. С., Манукян К. Л., Айвазян В. А., Погосян А. С., Казарян Н. П., Карагезян К. Г.</i> О возможности моделирования процессов, приводящих к нарушению метаболизма катехоламинов при шизофрении, на стадии биосинтеза норадреналина	11
<i>Гурвиц Б. Я., Алексанян С. С., Галоян А. А.</i> Исследование первичной структуры кальцийнезависимых активаторов кальмодулинзависимых ферментов	18
<i>Априкян В. С., Галоян К. А.</i> Гипоталамические пептиды повышают антиген-представляющую функцию макрофагов	
<i>Априкян В. С., Галоян К. А., Галоян А. А.</i> Гипоталамические пептиды повышают продукцию интерлейкина-1 мышечными перитонеальными макрофагами	
<i>Генгин М. Т., Вернигора А. Н.</i> Влияние эмоционально-болевого стресса на активность карбоксипептидазы Н (КФ. 3. 4. 17. 10) головного мозга крыс	39
<i>Хачатрян Г. С., Антосян А. А., Казарян А. Р., Хачатрян В. Г., Галстян Г. Г., Ваградян А. Г.</i> Активность рибонуклеазы и ДНК-зависимой РНК-полимеразы в мозгу при действии пирозоловых соединений	45
<i>Иванов А. Ш., Капралов А. А., Барык О. Я., Губченко С. В.</i> Влияние белков дитозоля эмбрионального и взрослого мозга на ДНК-полимеразную активность изолированных ядер мозга	52
<i>Априкян А. Г., Кочарян Н. В.</i> Влияние экстракта <i>Bryonia alba</i> на протениназную активность и синтез белков головного мозга и печени крыс	62
<i>Петросян С. Ам., Бояджян А. С., Карагезян К. Г.</i> Участие белковых и липидных компонентов мембран хромаффинных гранул в реакциях, катализируемых дофамин-β-гидроксилазой	70
<i>Степанян А. А., Манукян К. Г.</i> Изменение фосфолипидного состава протеолипидов миелина мозга крысы в ходе миелиногенеза	79
<i>Гарибян Д. В., Джагацпанян И. А., Даниелян И. С., Меликян Г. Г., Акопян А. Г., Бабаян Ю. С., Аветисян М. Г., Гарибджанян Б. Т.</i> Структура ДНК и возможные механизмы действия некоторых антиамнестических средств	88
<i>Симонян А. А., Степанян Р. А., Бадалян Р. Б., Акопова Т. М.</i> Функционирование митохондрий мозга при совместном воздействии на организм куриных эмбрионов низкой температуры среды инкубирования и ультрафиолетового облучения	94
<i>Ростомов М. А., Абрамян К. С., Калишян С. П.</i> Аденилатциклаза микроциркулярного русла надпочечников крыс	101

Краткие сообщения

<i>Карапетян Н. Г.</i> Взаимодействие мозговой фосфоглицератмутазы с изоферментами слюины	108
<i>Манукян Ш. Р., Априкян Г. В.</i> Сравнительное изучение влияний <i>Bryonia alba</i> и женьшеня на микросомное перекисное окисление липидов при иммобилизационном стрессе	113

Обзоры

<i>Галоян А. А.</i> Роль тимозинов в нервной и мышечной ткани	117
---	-----

CONTENTS

<i>Rosanov V. A., Gerasimyak G. R., Shafran L. M.</i> The influence of bis (N,tributylolovo) oxydes on Na^+ -dependent absorption of 1^{14}C GABA by the sections of rat cerebral cortex	3
<i>Boyajyan A. S., Manukyan K. L., Aivazyan V. A., Pogosyan A. S., Kazaryan N. P., Karagezyan K. G.</i> About the possibility of modeling the processes result in the disorder in catecholamine metabolism on the state of noradrenaline biosyntheses under the schizophrenia	11
<i>Guruits B. Ya., Alexanyan S. S., Galoyan A. A.</i> On the investigation of the primary structure of calcium independent activators of calmodulin-dependent enzymes	18
<i>Aprikian V. S., Galoyan K. A.</i> Hypothalamic peptides enhance the antigen-presenting function of macrophages	27
<i>Aprikian V. S., Galoyan K. A., Galoyan A. A.</i> Hypothalamic peptides enhance the interleukin-1 production by mouse peritoneal macrophages	34
<i>Gengin M. T., Vernigora A. N.</i> Influence of emotional-algesic stress on the activity of carboxypeptidase H (EC 3.4.17. 10) of rat brain	39
<i>Khachatryan G. S., Antonian A. A., Kazarian A. R., Khachatryan V. G., Galslian G. G., Vahradian H. G.</i> Ribonuclease and DNA-dependent RNA polymerase activity in brain under the effect of pyrazole compounds	45
<i>Ivanov A. P., Kapratov A. A., Baryk O. Y., Gubchenko S. V.</i> The action of cytosol proteins of embrional and adult brain on DNA-polymerase activity of brain nuclei	52
<i>Aprikian A. G., Kocharian N. V.</i> The influence of Bryonia alba extract on protein kinase activity and the synthesis of rat brain and liver proteins	63
<i>Petrosyan S. H., Boyajyan A. S., Karagezyan K. G.</i> The participation of the protein and lipid components of the chromaffin granule membrane in the reactions catalyzed by dopamine- β -monooxygenase	70
<i>Stepanian A. A., Manukian K. H.</i> Changes in composition of phospholipid moiety of rat brain myelin proteolipids during myellogenesis	79
<i>Gharibian G. V., Jaghatspanian I. A., Danteljan I. S., Melikjan H. H., Hakoptian H. G., Babayan Yu. S., Avetissian M. G., Garibjanian B. T.</i> Structure of DNA and the possible mechanisms of action of some antiamnestic drugs	88
<i>Simonian A. A., Stepanian R. A., Badalian R. B., Akopova T. M.</i> The function of brain mitochondria of hen embryos under the influence of low temperature and ultraviolet treatment	94
<i>Rostomian M. A., Abramian K. S.</i> Adenylate cyclase of microcirculatory bed of rat adrenals	101

Short communication

<i>Karapetian N. G.</i> Interaction of brain phosphoglycerate mutase with the enolase Isozymes	108
<i>Manukian Sh. R., Aprtkian G. V.</i> Comparative investigation of influences of Bryonia alba and ginseng on lipid peroxidation during the immobilization stress	113

Reviews

<i>Galoyan A. A.</i> Role of thymosin in nerve and muscle tissue	117
--	-----