

том 7, № 4, 1988

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՆՈՔԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

НЕЙРОХИМИЯ ՀԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 7, вып. 4
ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ԵՐԵՎԱՆ 1988

Ст. редактор *Э. А. Хачатурова*
Лит. сотрудник *Г. Р. Григорян*
Тех. редактор *Л. А. Азизбеян*

Сдано в набор 10.09.1988. г. Подписано к печати 20.01.1989. г. ВФ 03845.
Формат 70×108¹/₁₆. Бумага № 1. Высокая печать, п. л. 10,5. Усл. печ. лист. 14,7.
Учет, изд. 11,75. Тираж. 712. Заказ. 582. Издат. 7504. Цена 1 р. 65 к.
Адрес редакции: 375044, Ереван-44, ул. П. Севака 5/1, т. 28-17-70, 28-16-52.
Издательство АН АриССР, Ереван, 375019, пр. Маршала Баграмяна, 24 г.
Типография Издательства Академии наук АриССР, Ереван-19,
пр. Маршала Баграмяна, 24.

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛЮЯН — главный редактор

Г. В. АПРИКЯН, А. В. АРУТЮНЯН (зам. главного редактора),
А. С. АРУТЮНЯН (отв. секретарь), Я. В. БЕЛИК, Н. Н. ДЕМИН (зам.
главного редактора), К. Г. КАРАГЕЗЯН, П. Г. КОСТЮК, А. А. КРИ-
ЧЕВСКАЯ, В. К. ЛИШКО, Р. М. НАЛБАНДЯН, М. Ш. ПРОМЫС-
ЛОВ, В. И. РОЗЕНГАРТ, Т. М. ТУРПАЕВ, А. Я. ТЯХЕПЫЛД,
Г. С. ХАЧАТРЯН

Редакционный совет

Н. Г. АЛЕКСИДЗЕ, С. В. ГАСТЕВА, Р. Н. ГЛЕБОВ, Б. А. КАЗАРЯН,
Р. И. КРУГЛИКОВ, В. Г. МХИТАРЯН, В. С. ОГАНЕСЯН, М. И. ПРО-
ХОРОВА, А. Д. РЕВА, А. А. СИМОНЯН, А. М. УТЕВСКИЙ,
Е. М. ХВАТОВА, А. С. ЧЕРКАСОВА, Р. Н. ЭТИНГОФ

К СВЕДЕНИЮ ЧИТАТЕЛЕЙ!

Просим Вас своевременно оформить подписку на журнал «НЕЙРОХИМИЯ» на 1989 год.

Обращаем внимание подписчиков на то, что с 1988 года журнал «НЕЙРОХИМИЯ» в каталоге подписных изданий переведен в раздел «Центральные журналы» под новым индексом 70637. Журнал выходит 4 раза в год, цена одного номера — 1 руб. 65 коп.

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

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

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

Подписку на журнал «Нейрохимия» можно осуществить во всех отделениях «Союзпечати» (индекс для подписки — 70637), а за границей через агентство «Международная книга».

РЕДКОЛЛЕГИИ



УДК 547.952:547.963.3:591.481.1

НЕЙРОХИМИЧЕСКИЕ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ 2-ЭТИЛ-6-МЕТИЛ-3-ОКСИПИРИДИНА В НОРМЕ И ПРИ НАРУШЕНИИ СНА У КРЫС

СОКОЛОВА Н. Е., ТАРАНОВА Н. П., *ВОРОНИНА Т. А.,
*НЕРОБКОВА Л. Н., *МАРКИНА Н. В.

Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград
*Научно-исследовательский институт фармакологии АМН СССР, Москва

Цитофотометрическим исследованием на уровне отдельных нейронов и глиоцитов установлено, что вещество с антистрессорными свойствами 2-этил-6-метил-3-оксипиридина (З-ОП) вызывает изменение метаболизма белка и РНК ядер ствола, причем характер этих изменений оказался различным у интактных крыс и лишенных ПФС в течение 24 ч. У интактных крыс в дорзальном ядре шва (ДЯШ) препарат приводил к снижению количества только РНК в нейронах и глиоцитах, а в синем пятне (СП) — к снижению количества как РНК, так и белков. Эффект этого препарата в условиях депривации ПФС был другим: в ДЯШ накапливался избыток белков, а в СП содержание белка сохранялось на уровне контроля. Нейрофизиологические, поведенческие и электрофизиологические исследования, проведенные одновременно с нейрохимическими, свидетельствуют о том, что препарат не оказывает заметного влияния на интактных крыс, но нормализует сдвиги функционального состояния ЦНС, вызванные лишением ПФС. Предполагается, что в основе благоприятных эффектов З-ОП может лежать его регулирующее действие на биосинтез белков в нейронах и глиоцитах ядер ствола головного мозга.

Многостороннее влияние нарушений сна на процессы, лежащие в основе функциональной активности ЦНС, проявляется в изменении взаимосвязанных нейрохимических, поведенческих и электрофизиологических показателей [1]. Ранее было показано, что при экспериментальном нарушении сна у крыс происходят изменения нерастворимых белков, сходные с денатурационными, в клетках некоторых ядер ствола и во фракции синапсом [2], а также конформационные изменения структуры синаптических мембран [3]. Выявлены и другие нейрохимические изменения при лишении крыс парадоксальной фазы сна (ПФС), специфические лишь для определенных отделов головного мозга, в частности, нарушения метаболизма белков и нуклеиновых кислот [4] и серотонина [5] в серотонинергическом ДЯШ и норадренергическом—СП, участвующих в организации процесса сна. Задача поддержания работоспособности людей в экстремальных условиях требует выяснения механизмов нарушений сна и поиска средств их коррекции.

реальных условиях, в частности, в условиях вынужденного длительного бодрствования, настоятельно требует целенаправленного поиска средств коррекции этих нарушений. Среди средств, нормализующих нейрофизиологические нарушения, в последнее время привлекает внимание производное 3-окситиридина: 3-ОП. Учитывая тот факт, что это соединение обладает спектром свойств, повышающих резистентность организма к экстремальным воздействиям, таким, как стресс, гипоксия, лишение ПФС и способностью устранять некоторые проявления неврологических нарушений (в том числе амнезию), вызванных лишением ПФС [6—8], представляется весьма интересным исследовать и некоторые нейрохимические эффекты препарата 3-ОП с учетом поведенческих и электрофизиологических показателей его действия в норме и при депривации ПФС.

Целью настоящей работы явилось изучение корреляции между нейрохимическими и нейрофизиологическими эффектами производного 3-ОП в норме и при длительном лишении крыс ПФС (24 ч). С этой целью было выполнено цитоспектрофотометрическое исследование содержания белков, РНК и SH-групп в белках нейронов и глioneurons ядер ствола, ДЯШ и СП в сочетании с анализом биоэлектрической активности мозга и физиологическим контролем функционального состояния ЦНС животных по тесту «открытое поле» [9], широко используемого для оценки эффектов лекарственных препаратов, а также модели условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [8].

Материалы и методы

Работа выполнена на белых беспородных крысах-самцах массой тела 180—200 г. В опытах использовали 4 группы животных (по 6 крыс в каждой группе): I группа—контрольные крысы (введение физиологического раствора); II группа—введение 3-ОП интактным крысам, III группа—депривация ПФС—24 ч (введение физиологического раствора); IV группа—депривация ПФС—24 ч на фоне введения 3-ОП.

Эксперименты проводили по следующей схеме: оценивали исходный эмоциональный статус крыс [10] и ориентировочно-исследовательское поведение крыс по тесту «открытое поле», регистрируя вертикальные и горизонтальные перемещения, обследования отверстий и умыкания в течение 2 мин, а затем внутрибрюшинно крысам II и IV групп вводили препарат 3-ОП в дозе 50 мг/кг и через 30 мин после этого крыс сбучали УРПИ. Сразу после этого крыс подвергали 24-часовому лишению ПФС [8, 11] и снова измеряли уровень эмоциональности и ориентировочно-исследовательское поведение животных в «открытом поле». Затем проводили тестирование на сохранение УРПИ. За показатель степени сохранения УРПИ принимали латентное время захода в темный отсек камеры, наблюдая животных в течение 3 мин. Далее выявляли белки, нуклеиновые кислоты и SH-группы белков в срезах ДЯШ и СП как описано ранее [12, 13].

В тех же условиях эксперимента проводили исследования биоэлектрической активности головного мозга крыс у 4-х дополнительных групп животных. Для регистрации и анализа биопотенциалов использовался ксмп-

мске электроэнцефалографической аппаратуры фирмы «О. Т. Е. Biomedica». Регистрация биоэлектрической активности сенсомоторной области коры, дорзального гиппокампа и миограммы шейных мышц осуществлялась в течение 5 ч на электроэнцефалографе «Нейрограф-18» с последующей обработкой на нейрокompьютере «BAS-161». Оценивалась продолжительность засыпания (период от начала регистрации до момента появления первой медленноволновой фазы сна—МФС), продолжительность эпизодов бодрствования и двух фаз сна—ПФС и МФС. Проводился статистический анализ данных, полученных в нейрехимических и поведенческих исследованиях, с использованием критерия Стьюдента и модификации Уэлша, а также критерия Вилкоксона-Манна-Уитни [14].

Результаты и обсуждение

Влияние препарата 3-ОП на содержание белка в ядрах ствола. Содержание белков и нуклеиновых кислот исследовали в мультиполярных и овальных нейронах и в сателлитных глиоцитах центральной части ДЯШ, где сосредоточена большая часть серотонинергических нейронов. Установлено, что введение 3-ОП intactным крысам практически не влияло на содержание белков в нейронах и глиоцитах ДЯШ. Незначительное снижение количества свободных SH-групп оказалось недостоверным (рис. 1, а). Лишение крыс ПФС в течение 24 ч вызывало снижение содержания белков в нейронах и глиоцитах примерно на 30%, но достоверных изменений содержания SH-групп при этом не отмечено. По-видимому, эти изменения обусловлены усиленной функциональной активностью ДЯШ при длительной депривации ПФС, затрудняющей ход репаративных процессов и синтез белка в клетках ДЯШ. Предварительное введение препарата 3-ОП перед депривацией ПФС не только предотвращало уменьшение количества белков в нейронах и глиоцитах, но приводило к накоплению избыточного количества белка в обоих типах клеток, а также к сопутствующему увеличению количества SH-групп в белках (рис. 1, а), возможно, за счет усиленного синтеза белков-ферментов, содержащих SH-группы в активном центре, или синтеза мембранных белков, в том числе и рецепторных [15].

В СП, центральном адренергическом ядре (билатеральном), исследовали в основном веретеновидные нейроны и глиоциты, расположенные в непосредственной близости от этих нейронов, преобладающих в дорзальной части СП и составляющих меньшую часть нейронов в вентральной части СП [16]. Влияние 3-ОП на белки клеток СП (рис. 1, б) у intactных крыс оказалось иным, чем на белки клеток ДЯШ: в нейронах и глиоцитах содержание белков заметно снижалось (на 26 и 18% соответственно). Снижение количества SH-групп отмечено лишь в нейронах, но это изменение было на грани достоверности. Метаболический ответ клеток СП на лишение ПФС оказался также отличным от ответа клеток ДЯШ. В нейронах СП отмечено не снижение, а заметное повышение количества белков (на 31%) с сопутствующим повышением количества свободных

SH-групп (на 29%), но без достоверных изменений в глиоцитах. Предварительное введение препарата 3-ОП перед депривацией ПФС возвращало содержание белков и SH-групп к исходному уровню как в нейронах, так и в глиоцитах СП, но избыточного накопления белков, как в клетках ДЯШ, не отмечалось.

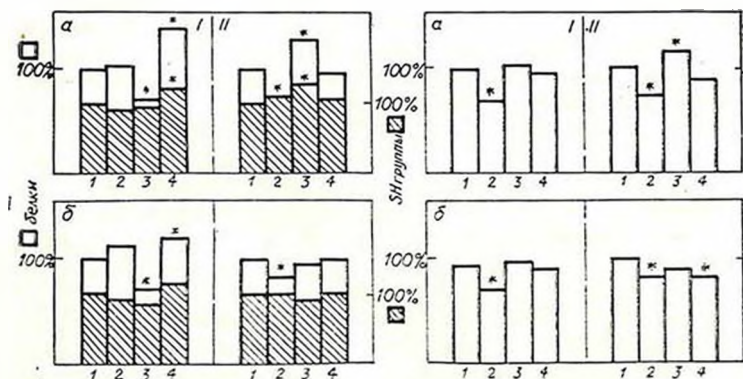


Рис. 1. Влияние препарата 3-ОП на содержание белков и их свободных SH-групп: I—дорзального ядра шва и II—синего пятна а—нейронах и б—глиоцитах у intactных крыс и в условиях депривации ПФС в течение 24 ч. 1—вспарный контроль; 2—введение 3-ОП intactным крысам; 3—депривация ПФС 24 ч; 4—депривация ПФС 24 ч на фоне введения 3-ОП.

По оси ординат—отклонение (и %) от данных парного контроля

Рис. 2. Влияние препарата 3-ОП на содержание РНК: I—дорзального ядра шва и II—синего пятна а—нейронах и б—глиоцитах у intactных крыс и в условиях депривации ПФС в течение 24 ч. Обозначения те же, что на рис. 1

Влияние 3-ОП на содержание РНК в ядрах ствола головного мозга. Содержание нуклеиновых кислот и белков в нейронах измеряли в цитоплазме, а в глиоцитах—в расчете на целую клетку. Принимая во внимание, что в ткани зрелого мозга деление клеток не происходит [17], все изменения количества в них нуклеиновых кислот следует относить за счет сдвигов в содержании цитоплазматической РНК, главным образом рибосомальной. У intactных животных препарат 3-ОП снижал содержание РНК в нейронах и глиоцитах ДЯШ на 33 и 30% соответственно (рис. 2, а). Снижение содержания РНК в ткани мозга было уже отмечено при длительном повышении активности НС и также при возбуждении холинергических структур введением антихолинэстеразных препаратов [18]. По-видимому, вызываемое препаратом 3-ОП уменьшение количества РНК в клетках ДЯШ свидетельствует о возбуждающем действии 3-ОП на это ядро у intactных животных. Лишение ПФС в течение 24 ч не вызывало заметных изменений в содержании РНК в клетках ДЯШ. Предварительное введение крысам 3-ОП перед депривацией ПФС не приводило к из-

изменению в содержании РНК ни в нейронах, ни в глиоцитах в отличие от действия этого препарата на интактных животных (рис. 2, а).

Характер влияния 3-ОП на содержание РНК в клетках СП у интактных крыс оказался сходным с его действием на клетки ДЯШ: количество РНК также снижалось и в нейронах (на 27%), и в глиоцитах (на 17%) (рис. 2, б). Однако введение препарата крысам перед лишением ПФС предотвращало повышение уровня РНК в нейронах, обычно наблюдающееся при лишении ПФС и приводило к некоторому уменьшению РНК в глиоцитах (на 17%). Следовательно, действие 3-ОП на РНК нейронов СП также оказалось различным у интактных крыс и крыс, подвергавшихся депривации ПФС: вместо снижения содержание РНК оставалось в пределах нормы, как и в нейронах ДЯШ. Но в глиоцитах ДЯШ и СП эффект 3-ОП оказался различным: в условиях депривации ПФС препарат препятствовал снижению уровня РНК только в глиоцитах ДЯШ, но не СП, где содержание РНК оставалось сниженным, как и при введении 3-ОП интактным крысам.

Таблица 1

Влияние препарата 3-ОП на ориентировочно-исследовательское поведение интактных крыс и в условиях депривации ПФС в течение 24 ч (число перемещений за 2 мин)

Горизонтальная активность	Контроль группа 1	Контроль +3-ОП группа 2	Лишение ПФС группа 3	Лишение ПФС +3-ОП группа 4
до депривации ПФС через 24 ч	20,0±1,4 15,0±1,1	20,0±1,7 14,0±1,4	21,0±2,8 19,0±1,9	24,0±2,3 12,0±2,8
Вертикальная активность				
до депривации ПФС через 24 ч	8,0±0,9 5,0±0,3	8,0±1,1 7,0±0,7	10,0±1,7 11,0±1,4	13,0±0,5 8,0±1,6
Заглядывание в отверстие				
до депривации ПФС через 24 ч	7,0±0,8 5,0±0,4	4,0±1,5 7,0±0,9	4,0±1,8 8,0±0,8	11,0±1,4 5,0±1,0
Умывание				
до депривации ПФС через 24 ч	1,0±1,5 0	0,5±0,0 0	1,0±0,8 1,0±0,4	2,0±1,4 2,0±0,8
Суммарная двигательная активность				
до депривации ПФС через 24 ч	36,0±3,5 25,0±1,1	32,0±3,5 28,0±2,1	36,0±4,8 33,0±3,0	50,0±3,9 26,0±4,6

* $p < 0,05$

Поведенческие эффекты препарата 3-ОП. По нашим данным, введение препарата 3-ОП в дозе 50 мг/кг внутривентриально не влияло на степень эмоциональной активности контрольных животных через 24 ч. Исследование ориентировочно-исследовательского поведения крыс показало, что у контрольных животных через сутки после первого тестирования отмечается уменьшение двигательной активности в «открытом поле» (табл. 1, I гр.), что может свидетельствовать об угнетении ориентировоч-

ной реакции при повторном тестировании. Аналогичная картина наблюдалась и после введения 3-ОП контрольным животным (II гр.), следовательно, 3-ОП не влияет и на ориентировочно-исследовательское поведение интактных крыс. Депривация крыс ПФС в течение 24 ч не влияла на степень эмоциональной активности крыс по сравнению с контролем, но изменяла их поведение в «открытом поле». Вместо уменьшения двигательной активности по сравнению с исходным фоном сохранялся высокий уровень двигательной активности за счет горизонтальных и вертикальных перемещений и заглядывания в отверстия (табл. 1, III гр.), что может свидетельствовать об увеличении тревожности после депривации ПФС. Но у крыс, предварительно получавших 3-ОП (IV гр.), двигательная активность после депривации ПФС снижалась, как и у контрольных животных I и II группы (табл. 1). Таким образом, 3-ОП, не влияя на поведение контрольных крыс в «открытом поле», нормализует сдвиги двигательной активности, вызванные у крыс лишением ПФС.

Препарат 3-ОП в используемой дозе не влиял на выработку и сохранность УРПИ у интактных животных (рис. 3): показатели реакции воспроизведения латентного времени захода крыс в темный отсек остались близкими к показателям контрольных животных, не получавших 3-ОП (68,6 и 57,7 с). Депривация ПФС в течение 24 ч непосредственно после обучения вызвала нарушение выработанной реакции УРПИ—уменьшалось время захода животных в темный отсек (рис. 3), что свидетельствует об амнезическом эффекте депривации ПФС. Предварительное введение 3-ОП перед обучением крысам, в дальнейшем подвергавшимся депривации ПФС, устраняло нарушения памяти и восстанавливало показатель сохранения УРПИ до уровня контрольных животных (рис. 3).

Влияние препарата 3-ОП на электрофизиологические показатели и цикл сон-бодрствование. Исследование биоэлектрической активности коры и гиппокампа показало, что у контрольных животных препарат оказывал лишь очень слабое влияние, сокращая латентное время засыпания (рис. 4; табл. 2) и незначительно увеличивая продолжительность фаз бодрствования за счет сокращения фаз МФС и ПФС (табл. 2). Депривация ПФС в течение 24 ч вызывала не только резкое сокращение продолжительности ПФС, но уменьшала продолжительность МФС, тогда как продолжительность бодрствования увеличивалась более чем в 2 раза (табл. 2). Предварительное введение препарата 3-ОП не препятствовало развитию нарушений структуры сна, вызванных депривацией ПФС, но резко сокращало периоды засыпания (табл. 2), что свидетельствует о его благоприятном влиянии на процесс сна при таком экстремальном воздействии, как длительная депривация ПФС.

При анализе биоэлектрической активности мозга из всех основных ритмов ЭЭГ в коре и гиппокампе особый интерес представляет тета-ритм гиппокампа, который играет роль индикатора и регулятора поведения. Установлено, что введение препарата 3-ОП контрольным животным вызывало на ЭЭГ усиление синхронизированной тета-активности в период ПФС не только в гиппокампе, но и в коре. Факт распространения тета-

Влияние оксипина на фазы цикла бодрствование-сон

Группы животных	Период засыпания (в с)	Процентное содержание различных фаз		
		МС	БС	Бодрствование
Контроль без депривации	$59,5 \pm 7,3$	$53,97 \pm 10,05$	$13,1 \pm 4,3$	$31,9 \pm 13,4$
Контроль во время депривации	$45,9 \pm 10,9$	$31,6 \pm 6,2$	$1,7 \pm 0,7$	$65,6 \pm 10,1$
3-ОП без депривации	$44,5 \pm 6,6$	$46,0 \pm 12,6$	$10,5 \pm 2,4$	$43,5 \pm 7,2$
3-ОП во время депривации	$10,2 \pm 4,1$	$28,1 \pm 6,3$	$1,9 \pm 0,8$	$69,9 \pm 5,1$

ритма на кору мозга отражает пространственную синхронизацию структур мозга в этом диапазоне частот, которая необходима для образования и упрочения условной связи.

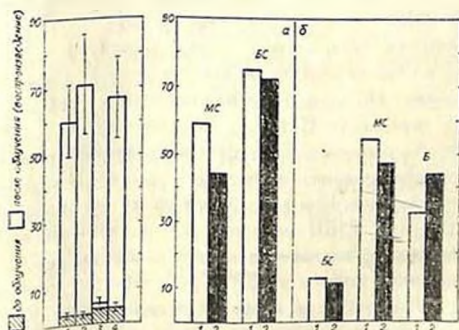


Рис. 3. Влияние препарата 3-ОП на сохранение УРПИ крыс в норме и после депривации ПФС в течение 24 ч. По оси ординат латентное время выполнения рефлекса в с. 1—виварный контроль; 2—введение 3-ОП intactным крысам; 3—депривация ПФС 24 ч; 4—депривация ПФС 24 ч на фоне введения 3-ОП

Рис. 4. Влияние препарата 3-ОП на структуру сна у крыс в норме: 1—латентное время наступления первой фазы медленноволнового сна (МС) и быстрого волнового сна (БС); II—продолжительность фаз сна и бодрствования (Б) за 5-часовой период регистрации ЭЭГ. 1—контроль; 2—введение 3-ОП intactным крысам. По оси ординат: I—время в мин; II—процентное содержание различных фаз сна от общей длительности сна

При депривации ПФС отмечены характерные изменения электрической активности коры и гиппокампа, выражающиеся в резком угнетении фазического компонента тета-ритма и появлении отдельных ирритативных знаков. Предварительное введение 3-ОП перед депривацией ПФС устраняет нарушение гиппокампального тета-ритма и нормализует нарушения спектрограммы коры и гиппокампа.

Обсуждение результатов

Представленные результаты свидетельствуют о том, что антистрессорный препарат 3-ОП вызывает определенные сдвиги метаболизма белков и РНК мозга у интактных крыс, но его действие на различные ядра ствола неоднозначно. В ДЯШ препарат 3-ОП приводил к снижению количества только РНК в нейронах и сателлитной глии, а в СП вызывал снижение содержания как РНК, так и белков в обоих типах клеток. Поскольку 3-ОП не вызывал неблагоприятных поведенческих сдвигов, а по данным ЭЭГ несколько сокращал потребность в сне и увеличивал период бодрствования, отмеченные нейрохимические изменения, по-видимому, следует расценивать как функциональные, а не патологические.

Введение этого препарата крысам перед длительной депривацией ПФС оказывало действие, отличное от его эффектов в условиях физиологической нормы: вместо снижения содержания белков и РНК в СП сохранялся их обычный уровень, а в нейронах ДЯШ даже накапливался избыток белков. Более того, 3-ОП предотвращал развитие сдвигов метаболизма белков и РНК, вызываемых лишением ПФС. Поскольку данные нейрофизиологических исследований свидетельствуют о нормализующем действии 3-ОП на поведенческие и электрофизиологические параметры в условиях лишения ПФС, и о его благоприятном действии на уровень функциональной активности ЦНС, то нейрохимические эффекты 3-ОП в этих условиях, по-видимому, тоже следует расценивать как адаптационные, способствующие приспособлению ЦНС к существованию животных в экстремальных условиях. Известно, что в цикле сон-бодрствование функциональная активность ДЯШ меняется, о чем свидетельствует динамика затухания электрической активности и высвобождение серотонина из клеток ДЯШ в различные фазы сна [20]. Кроме того, осуществляется медиаторное влияние ДЯШ и СП на корковые и гиппокампальные структуры, причем высвобождение медиатора в терминалях является высоко зависимым от активности нейронов этих ядер [19, 20]. Полученные нами результаты позволяют заключить, что перестройка метаболизма белков и РНК исследованных ядер ствола при лишении животных ПФС сопутствует изменению функционального состояния и других структур головного мозга, в частности коры больших полушарий и гиппокампа. Это подтверждает наличие не только морфологических и функциональных связей этих структур с ДЯШ и СП, но также и наличие метаболических связей между ними, что уже было отмечено ранее [21].

Подавление метаболизма белков в нейронах и глиоцитах ДЯШ при лишении ПФС коррелировало не только с удлинением периода бодрствования, сокращением продолжительности ПФС и МФС, но и с исчезновением характерного для ПФС фазического компонента тета-ритма в коре и гиппокампе. Угнетение тета-ритма, вероятно имеет прямую связь с поведенческими эффектами, т. е. выраженность его обоих компонентов отражает уровень активации структур мозга, необходимый для обучения и воспроизведения реакции. Ряд исследователей считают, что тета-ритм ха-

рактен не только для поискового поведения, но и для процессов извлечения информации из памяти [22]. Наблюдаемый нами факт распространения тета-ритма на кору отражает пространственную синхронизацию структур мозга в этом диапазоне частот, которая по теории М. Н. Ливанова [23] необходима для образования и упрочнения условной связи. Это согласуется с нашими данными о благоприятном действии препарата 3-ОП на выработку УРПН в экстремальных условиях депривации ПФС. Наблюдаемые поведенческие и электрофизиологические эффекты депривации ПФС могут быть следствием нарушения синтеза белков и в этих структурах мозга, что согласуется с данными ряда авторов, обнаруживших, что внутриутробное белковое голодание приводило к уменьшению длительности ПФС, изменению структуры сна по данным ЭЭГ, в частности уменьшению пиковой частоты тета-ритма [24].

Поскольку в условиях длительной депривации ПФС нами отмечено нормализующее действие препарата 3-ОП как на показатели белкового и нуклеинового обмена исследованных ядер, так и на поведенческие и электрофизиологические показатели, можно заключить, что в числе молекулярных механизмов, обеспечивающих реализацию благоприятных нейрофизиологических эффектов 3-ОП в экстремальных условиях, важную роль играет его способность регулировать процессы биосинтеза белка в нейронах и глионитах ядер ствола.

NEUROCHEMICAL AND NEUROPHYSIOLOGICAL EFFECTS OF 2-ETHYL-6-METHYL-3-HYDROXYPYRIDINE IN NORMAL RATS AND RATS WITH SLEEP DISTURBANCES

N. E. SOKOLOVA, N. P. TARANOVA, T. A. VORONINA, L. N. NEROBKOVA,
and N. V. MARKINA

Pavlov Institute of Physiology, USSR Academy of Sciences, Leningrad and
Research Institute of Pharmacology, USSR Academy of Medical Sciences,
Moscow

Cytophotometric study of individual neurons and glyocytes has demonstrated that 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine (3-HP), a substance possessing antistress properties, modifies metabolism of protein and RNA in stem nuclei. These changes were different in intact rats and rats deprived of REM-sleep for 24 hours. In intact rats the drug resulted in the decrease of only RNA level in neurons and glyocytes of the dorsal nucleus, however, it decreased the level of both RNA and proteins in locus ceruleus. The effect of the drug under the conditions of REM-sleep deprivation was different: excess of proteins was accumulated in *n. raphe dorsalis*, whereas the level of proteins in locus ceruleus was maintained at the control level. Neurophysiological, behavioural and electrophysiological studies performed concomitantly with neurochemical experiments provide evidence that the drug does not markedly affect intact rats, however it normalizes shifts in the func-

tional state of the CNS induced by REM-sleep deprivation. It is proposed that favourable effects of 3-HP may depend on its modifying effect on biosynthesis of proteins in neurons and glyocytes of brain stem nuclei.

ЛИТЕРАТУРА

1. Демин Н. Н., Козан А. Б., Моисеева Н. Н. Нейрофизиология и нейрохимия сна. Л., Наука, 1978.
2. Демин Н. Н., Шелепина Е. П., Неробкова Л. Н., Крапивин С. В., Воронина Т. А. Физиол. журн., СССР, т. 72, № 6, с. 723—727, 1986.
3. Нилова Н. С. Нейрохимия, т. 3, № 4, с. 347—352, 1984.
4. Панов А. Н., Маликов У. М. Цитология, т. 23, № 12, с. 1381—1385, 1981.
5. Маликов У. М. Нейрохимия, т. 3, № 4, с. 392—394, 1984.
6. Воронина Т. А., Крапивин С. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 12, с. 721—724, 1986.
7. Вальдман А. В., Воронина Т. А., Смирнов А. Д., Тилекеева У. М., Дюмаз К. М. Бюл. эксперим. биол. и мед., № 1, с. 60—62, 1985.
8. Маркина Н. В., Неробкова Л. Н., Воронина Т. А. Журн. высш. нерв. деят-сти, т. 36, вып. 5, с. 963—967, 1986.
9. Воронина Т. А., Вихляев Ю. И., Неробкова Л. Н. и др.—В кн.: Фензапепм, с. 145—151, Киев, 1982.
10. Гарибова Т. А., Рожанец В. В., Рахманкулова Н. Х., Воронин К. Э., Цонгова-Тютюкова Н., Стефанова Д., Тимофеева С. Э., Вальдман А. В. Медико-биологическая информация, Болгария, № 4, с. 8, 1985.
11. Jouvét D., Vimont P., Delorm F., Jouvét M. Comp. Rep. Soc. Biol., v. 158, № 4, p. 756—759, 1964.
12. Berube G. R., Pauris M. M., Kerkay J., Clark G. Stain. Technol., v. 41, p. 73—81, 1966.
13. Esterbauer H. Färbung Acta histochem., v. 47, № 1, p. 94—105, 1973.
14. Закс А. Статистическое оценивание, М., Статистика, 1976.
15. Александров В. Я. Реактивность клеток и белки, Л., Наука, 1985.
16. Белова Т. И., Голубева Е. А., Судаков К. В. Гомеостатические функции Locus coeruleus (синего пятна), М., Наука, 1980.
17. Mori S., Leblond C. P. J. Comp. Neurol., v. 139, p. 1—30, 1970.
18. Демин Н. Н., Рубинская Н. А. Физиол. журн., СССР, т. 73, с. 1638—1643, 1977.
19. Бабынина Н. Д.—В кн.: Регуляция нейромедиаторных механизмов деятельности мозга, с. 31—37, Минск, Беларусь, 1982.
20. Hery F., Tornaux J. P. J. Physiol., v. 77, № 2—3, p. 287—301, 1981.
21. Кленникова В. А., Глушенко Т. С., Тенчева Ц. Нейрохимия, т. 6, № 2, с. 254—258, 1987.
22. Симонов П. В. Мотивированный мозг, М., Наука, 1987.
23. Ливанов М. Н. Успехи физиол. наук, № 3, с. 3—22, 1986.
24. Morgane P. J., Anstlin K., Stok C., La France R., Bronzino J. P. Develop. Brain Res., v. 22, № 2, p. 211—218, 1985.

Поступила 21. IV 1988



УДК 577.612.015

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ БИОГЕННЫХ АМИНОВ НА СИНТЕЗ ГЛИКОПРОТЕИНОВ В НЕЙРОНАЛЬНОЙ КУЛЬТУРЕ МОЗГА КУРИНЫХ ЭМБРИОНОВ

СОЛОМОНИЯ Р. О., КОНДРАТЬЕВ А. Д., МАДЕРШПАХ К.

Институт физиологии им. И. С. Бериташвили АН ГССР, Тбилиси

"Институт прикладной молекулярной биологии Министерства
здравоохранения СССР, Москва

"Институт биохимии Биологического научно-исследовательского центра
АН ВНР, Сегед

Было изучено влияние низких концентраций (10^{-10} М) биогенных аминов при кратковременных интервалах (1—5 мин) инкубации на синтез гликопротеинов в культуре нейронов из переднего мозга куриных эмбрионов. Норадреналин во всех исследуемых случаях оказывает долговременное стимулирующее действие на этот процесс. Серотонин обуславливает временно зависимое ингибирование синтеза гликопротеинов в течение 1 ч после инкубации. За последующий час наблюдается стимулирование этого процесса. В случае дофамина ингибирующий эффект выражен только при 5-минутной инкубации без последующего увеличения скорости реакции гликозилирования. С помощью специфических лигандов к рецепторам биогенных аминов [(+)-L-алпренолол, мianserin, (-)-сульпирид] выявлено участие в процессах регуляции синтеза гликопротеинов соответственно β -адренорецепторов, 5_1 -серотониновых и D_1 -дофаминовых рецепторов. 12-О-тетрадеканол-13-ацетат и дибутирил-3-5-аденозинмонофосфорная кислота оказывают долговременное стимулирующее действие на синтез гликопротеинов.

Известно, что большинство синаптических белков нейронов являются гликопротеинами, которым отводится ведущая роль в детерминации и регулировании эффективности образования синаптических контактов [1, 2]. Показано, что фиксация следов памяти в головном мозгу сопровождается усиленным синтезом гликопротеинов [4—7]. Этот факт объясняется тем, что синаптическое ремоделирование считается одной из основных клеточных реакций, происходящих при консолидации следов долговременной памяти [8]. Поскольку гликозидная связь имеет аномерную конфигурацию и обладает способностью образовывать разветвленные структуры, предполагается, что олигосахаридные цепи несут на 3 порядка больше информации на единицу веса, чем белки и нуклеиновые кислоты [9].

Одним из актуальных вопросов метаболизма гликопротеинов является выяснение нейротрансмиттерной регуляции синтеза этих белков. При

изучении действия дофамина на реакции фукосилирования в срезах гиполокампа крыс было показано, что активирующее влияние биогенного амина проявляется лишь на 30-й день постнатального развития, что объясняется поздним онтогенетическим «созреванием» рецепторных участков [10]. С другой стороны, выявлено участие β -адренорецепторсвязанной аденилатциклазы в стимулировании N-гликозилирования белков в крысиных ацинарных, C₆-глиальных клетках, в фибробластах человека и в капиллярных эндотелиальных клетках [11—13]. Однако во всех этих случаях стимулирование в гликозилировании белков достигалось лишь после 1-часовой инкубации клеток с высокими концентрациями (10^{-5} М) изопротеренола [11—13].

Если регуляция синтеза гликопротеинов через β -адренорецепторы имеет определенную физиологическую роль, то следовало ожидать, что низкие концентрации норадреналина также вызовут аналогичный эффект. Это предположение поддерживается нашей ранней работой, где показано, что кратковременная инкубация (1—5 мин) первичной нейронально-глиальной культуры из мозга куриных эмбрионов с 10^{-10} М норадреналина приводит к заметному увеличению уровня cAMP [14]. Использование низких концентраций нейротрансмиттеров позволяет устранить проблему возможной десенситизации соответствующего рецептора.

В настоящей работе изучается влияние низких концентраций (10^{-10} М) биогенных аминов на синтез гликопротеинов в первичной культуре нейронов из переднего мозга куриных эмбрионов.

Материалы и методы

Первичную клеточную культуру нейронов получили с переднего мозга 8-дневных куриных эмбрионов с помощью механической диссоциации, проведением ткани через специальные сита с размерами пор 48 μ М [15] и засеванием на чашки Петри (диаметр 2,5 см), покрытых поли-L-лизинном, с частотой 5×10^5 клеток на чашу [16]. Клетки держали в минимальной среде Игла (2,5 мл на чашу), содержащей 15% телячьей фетальной сыворотки («Flow», Англия). В этих культурах практически не наблюдается присутствия глиальных клеток. Опыты проводились на пятый день культивирования.

Перед опытом с чашек Петри отбирали среду и добавляли ту же самую среду в объеме 0,5 мл. Конечные концентрации биогенных аминов и специфических лигандов к соответствующим рецепторам биогенных аминов составляли 10^{-10} М. В случае 12-О-тетрадеканонил-форбол-13-ацетата (ТРА) и дибутирил-3-5-аденозинмонофосфорной кислоты (дб-сАМР) конечные концентрации соответственно равнялись 10^{-5} , 10^{-9} и 10^{-7} , 10^{-8} М. Время инкубации составляло 1, 3 и 5 мин. После инкубации культуру тщательно промывали раствором Тироди и добавляли остаточную насыщенную среду в объеме 0,5 мл. Меченую L-6-[3 H]-фукосу (удельная радиоактивность 27 Кб/мМ, «Amersham», Англия) в количестве 0,5 μ Ки добавляли сразу же после отмывки или 1 ч спустя. В обоих случаях время:

мечения клеток составляло 1 ч. После мечення радиоактивной фукозой клеточную культуру тщательно промывали раствором Хенкса, клетки соскребали, суспендировали и гомогенизировали в буфере 50 мМ трис-HCl, рН 7,4, содержащего 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (0,5 мл буфера на 1 чашу Петри). Включенную радиоактивность определяли следующим образом: к 150 мкл гомогената добавляли равный объем 20%-ной ТХУ и фильтровали на фильтрах CF/F («Whatman», Англия). Фильтры промывали 50 мл 10%-ной ТХУ и 5 мл этанола и просчитывали в толуальном сцинтилляторе. Белок определяли по методу Bradford [17]. Значение включенной радиоактивности определяли как количество импульсов на мг белка.

С каждой чашки Петри количество белка и включенной радиоактивности определяли двумя параллельными измерениями. Количество экспериментов было не меньше 12. Результаты обрабатывали статистическим методом неравноточных измерений. Достоверность различия и уровень значимости определяли по распределению Стьюдента для малых выборок. Уровень значимости во всех специально не отмеченных случаях $p < 0.001$.

Результаты и обсуждение

Влияние норадреналина на включение фукозы в ТХУ нерастворимую фракцию нейрональных клеток показано на рис., а, из которого видно, что даже 1-минутная стимуляция β -адренорецепторов 10^{-10} М норадреналином увеличивает синтез гликопротеинов на 45%. 3- и 5-минутная стимуляция увеличивает этот процесс соответственно на 197 и 300% по сравнению с контролем. Представляется интересным то, что 3- и 5-минутная стимуляция нейрональных клеток норадреналином оказывает долговременный эффект на реакцию гликозилирования. В последнем случае, то есть в интервале 1—2 ч после стимулирования, синтез гликопротеинов выше контрольного уровня соответственно на 59 и 55%. Равные концентрации (—)-L-алprenолола (кроме одного случая: 5-минутная инкубация, временной интервал 1—2 ч) достоверно уменьшают стимулирующий эффект норадреналина, свидетельствующий об участии β -адренорецепторов в этом процессе. Можно предположить, что при долговременной инкубации (5 мин) нейрональных клеток с норадреналином происходит также частичная активация α -адренорецепторов.

Серотонин в отличие от норадреналина оказывает четкий ингибирующий эффект на синтез гликопротеинов в интервале времени 0—1 ч (рис., б). В зависимости от времени инкубации серотонин ингибирует этот процесс соответственно на 29, 41 и 49%. Однако ситуация полностью меняется в интервале времени 1—2 ч, когда скорость реакции гликозилирования восстанавливается до нормального уровня и при 5-минутной инкубации статистически достоверно ($p < 0.05$) превосходит контроль. Для серотонина и серотонин+миансерина эти величины соответственно равняются 23 и 28%. Таким образом, через определенный интервал времени после активации серотонинового рецептора происходит компенсаторное увеличение синтеза гликопротеинов в нейрональных клетках. Доба-

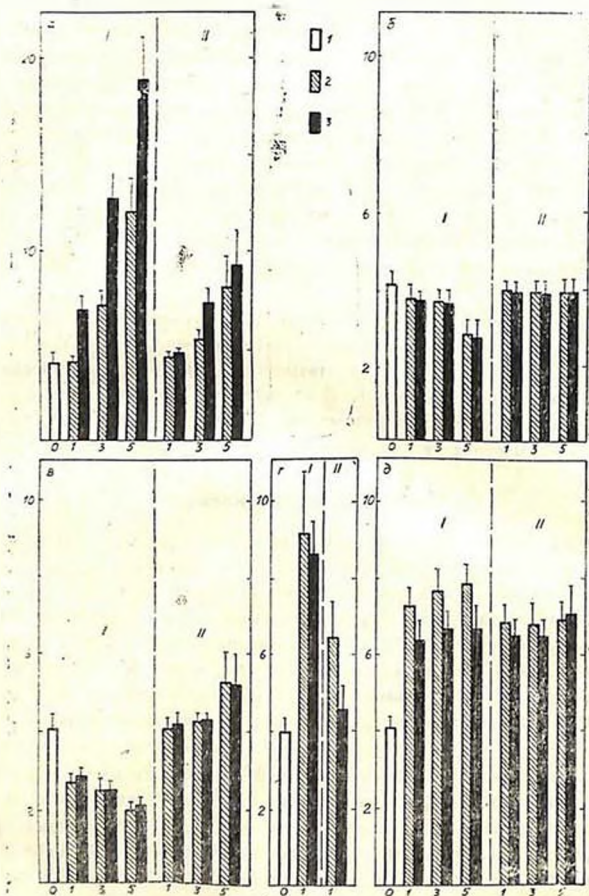


Рис. Включение L-6-[3 H]-фукозы в ТХУ нерастворимую фракцию нейрональных клеток мозга куриных эмбрионов после инкубации с норэпинефрином (а), серотонином (б), дофамином (в), ТРА (г), db-cAMP (д). Время мечения радиоактивной фукозой во всех случаях—1 ч. Включение L-6-[3 H]-фукозы сразу же после инкубации (интервал времени 0—1 ч)—I и через 1 ч после инкубации с различными аффекторами (интервал времени 1—2 ч)—II. По оси абсцисс—время инкубации с различными аффекторами (мин), по оси ординат—включение L-6-[3 H]-фукозы, $\text{имп.} \times 10^{-4} / \text{мг белка}$: 1—контрольные клетки, 2—обработка 10^{-10} М норэпинефрином и 10^{-10} М алпренололом, 3—обработка 10^{-10} М норэпинефрином; б: 1—контрольные клетки, 2—обработка 10^{-10} М серотонином и 10^{-10} М мiansергином, 3—обработка 10^{-10} М серотонином; в: 1—контрольные клетки, 2—обработка 10^{-10} М дофамином и 10^{-10} М сульпинидом, 3—обработка 10^{-10} М дофамином; г: 1—контрольные клетки, 2—обработка 10^{-8} М ТРА, 3—обработка 10^{-8} М ТРА; д: 1—контрольные клетки, 2—обработка 10^{-7} М db-cAMP, 3—обработка 10^{-8} М db-cAMP

ление вместе с серотонином мiansерина не меняет результата действия серотонина, указывающего на участие в этом процессе S_1 -серотониновых рецепторов. Как известно, этот субтип рецепторов опосредует активирование аденилатциклазной системы, хотя недавно появились данные о существовании уникальных S_1 -серотониновых рецепторов, связанных с фосфоинозитольным обменом [18]. Требуется дополнительные исследования для выяснения вопроса о том, какой из вторичных мессенджеров опосредует обнаруженный нами эффект серотонина.

Влияние дофамина на реакцию фукозиллирования имеет менее выраженный характер по сравнению с норадреналином и серотонином (рис., в). 1- и 3-минутная инкубация клеток с дофамином ведет к слабому, статистически недостоверному ($p < 0.2$) ингибированию этого процесса в интервале времени 0—1 ч. Лишь 5-минутная инкубация вызывает достоверное ($p < 0.01$) ингибирование. Добавление совместно с дофамином специфического антагониста D_2 -дофаминовых рецепторов (—)супиприда не элиминирует эффект дофамина, указывающий на предположительное участие в этом процессе D_1 -дофаминовых рецепторов, которые активируют аденилатциклазную систему. В интервале времени 1—2 ч после инкубации синтез восстанавливается до нормального уровня, но компенсаторного увеличения этого процесса, как в случае серотонина, не происходит (рис., в). По-видимому, низкой плотностью дофаминовых рецепторов или их эмбриональной «незрелостью» можно объяснить тот факт, что в наших экспериментах 1- и 3-минутная инкубация с дофамином не оказывают влияния на этот процесс. К сожалению, на сегодняшний день данные о наличии дофаминовых рецепторов на нейрональных клетках куриных эмбрионов отсутствуют.

Было исследовано также влияние низких концентраций ТРА и дб-сАМР на синтез гликопротеинов. Как 10^{-5} М, так и 10^{-9} М ТРА оказывает длительное стимулирующее действие на синтез гликопротеинов даже при 1-минутной стимуляции (рис., г). 1-, 3- и 5-минутная инкубация с 10^{-7} М и 10^{-8} М дб-сАМР также вызывает длительный стимулирующий эффект на включение меченой фукозы в белковую фракцию нейрональных клеток (рис., г).

Как видно из полученных результатов, довольно низкие концентрации биогенных аминов при кратковременных инкубациях с культурой первичных нейрональных клеток дают глубокие и долговременные изменения в метаболизме гликопротеинов, подтверждая тем самым правильность поставленной задачи. Надо отметить, что для осуществления этих долговременных эффектов необходимым является проведение эксперимента в насыщенной нейрональной среде (см. «Материалы и методы»), указывающего на важную роль выделяемых нейрональными клетками трофических и других факторов, необходимых для поддержания и функционирования сформировавшейся нейрональной сети на высоком интегративном уровне.

Изменения синтеза гликопротеинов могут отразить изменения общего синтеза белка или специфическую активацию ферментов гликозиллирования. В случае норадреналина, по литературным данным, предпочтение

отдается второму пути [11]. Однако требуется дальнейшее уточнение этого вопроса с одновременным применением специфических меченых предшественников синтеза белка и гликопротеинов.

Долговременное увеличение синтеза гликопротеинов является обязательным звеном для консолидации следов памяти. Этот процесс должен быть специфичным для памяти, так как даже при долговременной посттетанической потенциации, которая рассматривается как физиологический субстрат памяти, не наблюдается достоверного усиления реакции гликозилирования [11]. Полученные нами результаты могут указывать на специфическую роль норадреналина как триггера для долговременного увеличения синтеза гликопротеинов. Обнаруженный феномен следует учитывать при изучении биохимических основ долговременной памяти.

STUDY OF THE EFFECT OF BIOGENIC AMINES ON GLYCOPROTEIN SYNTHESIS IN NEURONAL CULTURE FROM CHICK EMBRYO BRAIN

R. O. SOLOMONIA, A. D. KONDRATIEV*, and K. MADERSPACH**

Beritashvili Institute of Physiology, Georgian Academy of Sciences, Tbilisi, USSR.

*Institute of Applied Molecular Biology, Moscow, USSR and Institute of

**Biochemistry, Biological Research Center, Hungarian Academy of Sciences, Szeged, Hungary

We studied the effect of brief incubations (1–5 min) with low concentrations of biogenic amines (10^{-10} M) on glycoprotein synthesis in neuronal cultures from chick embryo forebrain. Noradrenalin in all cases induces long-term stimulation of glycoprotein synthesis. Exposure to serotonin inhibits glycoprotein synthesis in a time dependent fashion during the first hour. During subsequent hour stimulation of this process is observed. Dopamine inhibits the glycosylation reaction only after 5 min of incubation, without subsequent recovery. Experiments with specific ligands interacting with biogenic amine receptors ((–)-L-alprenolol, mianserin, (–)-sulpirid) demonstrate the involvement of beta-adrenoreceptors, 5_1 -serotonin and D_1 -dopamine receptors in the regulation of glycoprotein synthesis. 12 O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate and dibutyryl-2-5-adenosine monophosphoric acid induce long-term stimulation of glycoprotein synthesis.

ЛИТЕРАТУРА

1. Barondes S. H.—In: The Neurosciences; Second Study Program (ed. F. O. Schmitt), p. 747–760, Rockefeller University Press, New-York, 1970.
2. Irwin L. N.—In: Review of Neuroscience (eds. S. Ehrenpreis, J. I. Kopin), p. 137–179, Raven Press, New-York, 1974.
3. Kelly P. T., Cotman C. W. J. Biol. Chem., v. 252, № 3, p. 786–794, 1977.
4. Sukumar R., Rose S. P. R., Burgane R. D. J. Neurochem., v. 34, № 4, p. 1000–1006 1980.

5. Popov N., Sulhzeck S., Pohle W., Matthies H. *Neuroscience*, v. 52, p. 161—167, 1980.
6. Rose S. P. R., Harding S. *Neuroscience*, v. 12, № 3, p. 663—667, 1984.
7. Pohle W., Acosta L., Ruthrich H., Krug M., Matthies H. *Brain Res.*, v. 410, № 2, p. 245—256, 1987.
8. Rose S. P. R. *Neuroscience*, v. 12, № 4, p. 811—821, 1981.
9. Cook G. M. *J. Cell Science*, v. 4, suppl., p. 45—71, 1986.
10. Lobner B., Iork R., Matthies H.—In: *Molecular basis of neuronal function* (eds. S. Tucek, S. Stipek, F. Stasny, J. Krivanek), p. 404. Prague, 1986.
11. Banerjee D. K., Kousvelari E. E., Baum B. J. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 126, № 1, p. 123—129, 1985.
12. Kousvelari E. E., Grant S. R., Baum B. J. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA, Biol. Sci.*, v. 80, № 20, p. 7146—7150, 1986.
13. Banerjee D. K., Kousvelari E. E., Baum B. J. *Federat. Proc.*, v. 45, № 6, p. 1681, 1986.
14. Maderspach K. *Cell. Mol. Biol.*, v. 26, № 2, p. 335—340, 1980.
15. Booher J., Sensenbrenner M. *Neurobiology*, v. 2, № 1, p. 95—105, 1972.
16. Sensenbrenner M., Maderspach K., Letskovits L., Juros G. G. *Devel. Neurosci.*, v. 1, p. 90—101, 1978.
17. Brudford M. *Anal. Biochem.*, v. 72, № 2, p. 248—254, 1976.
18. Conn P. J., Sanders-Bush E., Hoffman B. J., Hartig P. R. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 83, № 12, p. 4085—4089, 1986.

Поступила 11. IV 1988

Клиническая нейрохимия. Под ред. Н. S. Bachelard, G. G. Lunt и С. D. Marsden. Изд. Academic Press, Лондон, Англия, 1986 г., т. I, 286 с. и т. 2, 197с.

Clinical Neurochemistry. Ed. by Н. S. Bachelard, G. G. Lunt and С. D. Marsden. Academic Press, London, England, 1986, v. 1, 268p; v. 2, 197p.

Многотомное издание работ по клинической нейрохимии публикует обзоры по неврологическим и психиатрическим расстройствам. Каждый обзор содержит научные и клинические данные и перспективные направления, излагаемые в тесном соавторстве клиницистами и учеными в области фундаментальных наук. В первом томе рассматриваются болезнь Хантингтона и миастения, а второй том посвящен клинике и патофизиологии заболеваний, связанных с демиелинизацией.



УДК 577.152.277:612.8.015

ADP-РИБОЗИЛИРОВАНИЕ В СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАНАХ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСАРУТЮНЯН А. В., МОВСЕСЯН Н. О., БУРНАЗЯН А. Б.,
ЕРАНЯН С. С., ГЕВОРКЯН Г. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Установлено, что интенсивность ADP-рибозилирования белков синаптических мембран (СМ) коры больших полушарий головного мозга крыс возрастает более чем в 15 раз при их хранении в течение 20 ч при комнатной температуре. Показано, что это не связано с включением свободной ADP-рибозы в белки СМ неферментативным путем вследствие усиления NAD-гликогидролазного расщепления NAD в этих условиях.

Ряд данных свидетельствует о наличии в СМ, наряду с моно-ADP-рибозилтрансферазой, поли-(ADP-рибоза)синтетазной активности. При исследовании моно-ADP-рибозилирования белков СМ было обнаружено, что цистеин и гистидин являются более эффективными ингибиторами этого процесса по сравнению с Met-аргинином. Исходя из этого, можно допустить, что все эти аминокислоты могут выступать в качестве акцепторов [^{14}C]ADP-рибозы в белках СМ.

ADP-рибозилирование, являющееся одним из наиболее распространенных путей посттрансляционной модификации белков, широко представлено в животном организме [1, 2]. В последнее десятилетие появились работы, свидетельствующие о значимости этого процесса в НС [3—6]. По данным ряда авторов, ADP-рибозилированию подвергаются белки СМ головного мозга, при этом при участии специфической моно-ADP-рибозилтрансферазы осуществляется перенос единственного ADP-рибозного фрагмента NAD на гуанидиновые группы акцепторных структур СМ [4, 6]. Наряду с этим, по мнению Mandel, в синаптических митохондриях имеется также поли-(ADP-рибоза)синтетазная активность, обнаруженная ранее в ядрах клеток различных тканей [1, 2], в том числе и нервной [3].

Эти исследования побудили нас более детально изучить и охарактеризовать процесс ADP-рибозилирования в нервных окончаниях.

Материалы и методы

Синапсомы коры больших полушарий мозга белых крыс выделяли методом Whittaker [7] в градиенте сахарозы 0,32:0,8:1 М. СМ изолировали после осмотического шока синапсом при 0—4° [8]. Уровень ADP-рибозилирования определяли по включению ADP-рибозного остат-

ка NAD в белки СМ. Инкубационная смесь (0.35 мл) содержала 84 пмоль [аденозин- ^{14}C]NAD («Amersham», Англия) с удельной радиоактивностью 287 мКи/ммоль, 50 мМ трис-НСI буфера рН 7.5, 0.5 мМ дитиотрептола и 150 мкг синапсосомного белка. Процесс ADP-рибозилирования исследовали в присутствии 10 мМ тимидина, 0.5 мМ никотинамидмоноуклеотида (NMN), 10 мМ никотинамида (NAm), 20 мМ изониазида (INH), 5 мМ АТФ, GTP и 20 мМ аминокислот или их производных (лизин, глутамат, цистеин, гистидин и метиловый эфир аргинина). Инкубацию проводили 2 ч при 26°, реакцию останавливали охлажденной 25%-ной ТХУ. Кислотонерастворимый осадок наносили на фильтры «Millipore» (США) с размером пор 0,6 мкм и последовательно промывали 10 мл 25-ной ТХУ и 15 мл этанола. Фильтры помещали в сцинтилляционные сосудики и растворяли в 0.45 мл диметилсульфоксида в течение 1 ч при 37°. Радиоактивность измеряли, используя сцинтиллятор Брея, в сцинтилляционном счетчике SL-4221 («Intertechnique», Франция).

Белок определяли по методу Lowry и соавт. [9], активность NAD-гликогидролазы спектрофотометрически при 327 нм по образованию NAD-CN комплекса [10].

Результаты исследования

В табл. 1 приведены данные о включении ADP-рибозного остатка [аденозин- ^{14}C]NAD в белки СМ при использовании их различных препаратов. Этот процесс не протекает в интактных синапсосомах и наблюдается лишь при их разрушении и выделении СМ. Включение метки возрастает более чем в 15 раз при хранении СМ при комнатной температуре в течение 20 ч, причем независимо от присутствия ингибитора протеолиза 2 мМ фенилметилсульфонилфторида (PMSF). Это указывает на то, что повышение интенсивности ADP-рибозилирования не связано с протеолитическим распадом белков СМ при их хранении. Уровень ADP-рибозилирования заметно снижается при наличии в среде тимидина, ингибирующего активность поли- (ADP-рибоза) синтетазы в ядерной фракции мозга [3] и других органов [1, 11]. При этом отмечается примерно такое же соотношение между включением метки в белки интактных и хранившихся СМ как в опытах без добавления тимидина.

Как видно из данных, приведенных на рис. 1, а, б, оптимальным условием для ADP-рибозилирования СМ мозга оказалась 2-часовая инкубация в диапазоне рН 7.0—8.0, что особенно четко проявлялось при инкубации в отсутствие тимидина. Исходя из этого, последующие эксперименты проводили при 2-часовой инкубации при рН 7.5 СМ, предварительно выдержанных 20 ч при комнатной температуре.

Как показали наши исследования, в указанной фракции СМ обнаруживается значительная активность NAD-гликогидролазы (распад NAD под влиянием этого фермента составляет 19.4 нмоль/мг белка вместо 7.02 в СМ, хранившихся при 0°), вследствие чего нельзя исключить, что при инкубации СМ с меченым NAD образуется ADP-рибоза, которая в после-

дующем может неферментативным путем конъюгировать с белками СМ, как это описано в отношении митохондрий печени и сердечной мышцы [12]. С целью проверки этого предположения было исследовано ADP-рибозилирование СМ в присутствии ингибиторов NAD-гликогидролазы INH [13], NAm, ATP [14, 15] и GTP [15], а также NMN [16]. Полученные резуль-

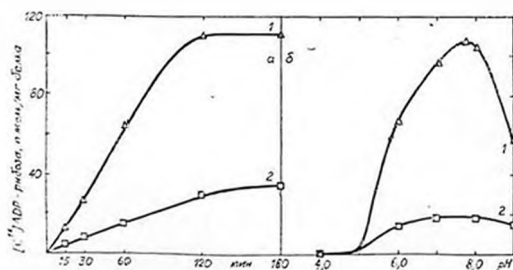


Рис. 1. Зависимость ADP-рибозилирования синаптических мембран коры больших полушарий мозга от времени инкубации при pH 7,5 (а) и величины pH при 2-часовой инкубации (б). 1—в отсутствие тимидина; 2—п присутствии тимидина

Таблица 1

ADP-рибозилирование синаптических мембран мозга при различных условиях их хранения (в пмоль [14 C]ADP-рибозы/мг белка), $n=6$

Методы хранения	Условия эксперимента	
	без тимидина	с тимидином
Синапсомы	0	0
Синаптические мембраны, хранившиеся при 0	7,48	1,78
Синаптические мембраны, хранившиеся 20 ч при 25	112,74	32,10
Синаптические мембраны, хранившиеся с PMSF 20 ч при 25	105,60	31,75

таты указывают на то, что, независимо от наличия тимидина в среде инкубации, NAm и INH ингибируют процесс ADP-рибозилирования в среднем на 40—50%, ATP и GTP полностью подавляют включение меченой ADP-рибозы из [14 C]NAD в белки СМ, а NMN оказывает незначительное влияние на этот процесс (рис. 2).

В следующей серии экспериментов исследовалось влияние некоторых аминокислот, служащих акцепторами ADP-рибозы при модификации белков путем ADP-рибозилирования, на этот процесс в СМ при их кратковременной или продолжительной инкубации с тимидином и без него. Как видно из данных, приведенных в табл. 2, наиболее эффективными ингиби-

торами ADP-рибозилирования в отсутствие тимидина являлись цистеин и гистидин, затем аргинин и глутамат. При наличии тимидина в среде инкубации ингибирующее действие цистеина было еще более заметно и значительно превосходило эффект гистидина. Наряду с этим, ингибирование под влиянием аргинина было более выражено при непродолжительной инкубации СМ с меченым NAD, а глутамат был совсем не эффективен. Ли-

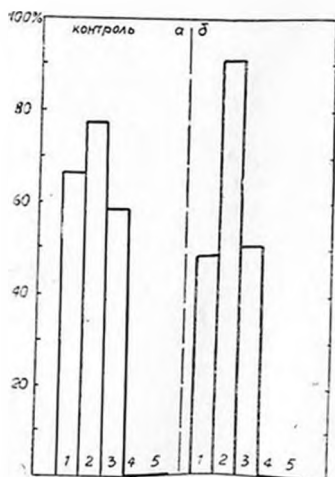


Рис. 2. Ингибирование ADP-рибозилирования синаптических мембран коры больших полушарий мозга под влиянием ингибиторов NAD-глицкогидролазы (в %). 1—NAD, 2—NMN, 3—INH, 4—ATP, 5—GTP. а—в присутствии тимидина, б—в отсутствии тимидина

зин не оказывал действия на ADP-рибозилирование белков СМ, независимо от наличия тимидина в среде инкубации.

Таблица 2

Ингибирование ADP-рибозилирования белков синаптических мембран (в %) под влиянием аминокислот (n=6)

Аминокислоты (10 мм)	Условия опыта			
	без тимидина		с тимидином	
	30	120	30	120
Мет-аргинин	49	40	33	15
Гистидин	71	53	57	56
Цистеин	72	77	83	97
Лизин	0	0	0	0
Глутамат	20	41	0	0

Обсуждение результатов

Lester и соавт. в экспериментах, приведенных на лиэризованных синапсосах электрического органа *Torpedo*, впервые описали ADP-рибозилирование мембранных синапсомных белков [4]. Впоследствии ис-

следованиями Фоменко и соавт. [6] было установлено, что аналогичный процесс осуществляется в СМ головного мозга крыс. Было показано, что уровень включения меченой ADP-рибозы в СМ был при этом невысок и составлял не более 2% от используемой метки, и весь процесс практически завершался в течение 40 мин инкубации [6]. Авторы склонны объяснять это недостаточной доступностью мембранных акцепторов ADP-рибозы и наличием в экстрактах СМ ингибитора процесса ADP-рибозилирования, по аналогии с результатами, полученными на мембранах щитовидной железы [17].

В наших опытах с СМ, выдержанными в течение 20 ч при комнатной температуре, наблюдался значительно более высокий уровень ADP-рибозилирования: процесс завершался лишь через 120 мин инкубации и при этом расходовалось около 12% от используемого [^{14}C]NAD. Предварительные данные, полученные нами с применением радиоавтографии, свидетельствуют о том, что степень включения меченой ADP-рибозы в белки СМ увеличивается при их хранении. Это может быть связано с тем, что вызванная хранением при комнатной температуре деструкция СМ приводит к высвобождению из них акцепторных белков, а также соответствующих мембраносвязанных ADP-рибозилтрансфераз. Нельзя также исключить наличие в интактных СМ ингибитора ADP-рибозилирования [6, 17], подвергающегося инактивации в процессе их хранения при комнатной температуре.

Значительный интерес представляют данные, полученные нами в отношении действия тимидина на процесс ADP-рибозилирования СМ головного мозга крыс. Следует указать, что поли-(ADP-рибоза)синтетазная активность связана исключительно с фракцией ядер в головном мозгу [3] и других органах [1, 11]. Поэтому многие исследователи при изучении ADP-рибозилирования в других субклеточных фракциях обычно не принимают во внимание активность этого фермента. Тем не менее, полученные нами данные об ингибировании ADP-рибозилирования тимидином указывают на возможность наличия поли-(ADP-рибоза)синтетазы в синапсомной фракции мозга крыс. Это предположение подтверждается тем, что в отсутствие тимидина процесс ADP-рибозилирования несколько ингибируется глутаматом, являющимся, наряду с лизином, акцептирующей аминокислотой при образовании О-гликозидных конъюгатов с поли-(ADP-рибозой) [1]. Однако для окончательного суждения необходимы дополнительные исследования, поскольку, исходя из полученных данных, нельзя полностью исключить ингибирующее влияние тимидина на процессы моно-ADP-рибозилирования, так как ингибиторы поли-(ADP-рибоза)синтетазы, к которым, наряду с тимидином, относятся также бензамид, 3'-аминобензамид и NAM, не являются строго специфическими [2].

Интенсивность ADP-рибозилирования в различных органах тесно связана с уровнем внутриклеточного NAD [15, 18], поэтому мы использовали ряд ингибиторов NAD-гликогидролазы, для того чтобы предотвратить его распад в СМ. Вопреки нашим ожиданиям, почти все исполь-

зуемые соединения одновременно с подавлением активности NAD-гликогидролазы (неопубликованные данные) ингибировали включение меченой ADP-рибозы в белки СМ (рис. 2). Исходя из полученных данных, можно было предположить, что в СМ функционирует система неферментативного ADP-рибозилирования, обнаруженная ранее в митохондриях печени и сердечной мышцы [12]. Образующаяся в данном случае под влиянием NAD-гликогидролазы ADP-рибоза переносится неферментативным путем на акцепторные белки с образованием устойчивых к NH_2OH конъюгатов [12, 19], причем этот процесс, в отличие от ферментативного ADP-рибозилирования, имеет два выраженных оптимума pH при 4,0 и 9,0 [12]. Как показали наши исследования, в СМ ADP-рибозилирование не осуществляется при pH 4,0, имеет максимум при pH 7,5 (рис. 1, б) и является крайне нестабильным по отношению к NH_2OH . Кроме того, уровень ADP-рибозилирования почти не претерпевает изменений в присутствии NMN, который в применяемой нами концентрации ($5 \cdot 10^{-4}$ М) полностью предотвращает, согласно данным Spell и соавт., синапсомный распад NAD [16]. Все эти доводы свидетельствуют о ферментативном характере исследуемого нами процесса ADP-рибозилирования.

Полученные результаты позволяют полагать, что исследуемые нами ингибиторы NAD-гликогидролазы, за исключением NMN, подавляют также процесс ADP-рибозилирования в СМ, что ранее было доказано в отношении NAM, являющегося универсальным ингибитором ADP-рибозилтрансфераз различного происхождения [1, 2]. Особый интерес представляют в этом аспекте ингибирование ADP-рибозилирования под влиянием ATP и GTP, описанное ранее в исследованиях, проведенных на мембранах щитовидной железы [17]. По данным Ноппа и Mandel [15], ATP и GTP являются достаточно эффективными ингибиторами NAD-гликогидролазы в плазматических мембранах нейронов и глиоцитов [15], однако в отличие от всех остальных ингибиторов этого фермента, указанные нуклеозидтрифосфаты вызывают полное подавление процесса ADP-рибозилирования в СМ (рис. 2). Аналогичные результаты были получены также другими исследователями в отношении ATP [6], которые склонны были объяснить это явление присутствием в СМ ATP-активируемого фермента, ответственного за удаление ADP-рибозы из рибозилированных белков, а также снижением степени их ADP-рибозилирования за счет усиления фосфорилирования под влиянием мембраносвязанных протениназ.

По мнению Халмурадова и соавт. [6], ADP-рибозилирование СМ осуществляется моно-ADP-рибозилтрансферазой, строго специфичной по отношению к гуанидиновым группам остатков аргинина. Это подтверждается исследованиями Lester и соавт. относительно ADP-рибозилирования синапсомных белков в присутствии холерного токсина, обладающего активностью аргининспецифичной ADP-рибозилтрансферазы [4]. В наших экспериментах, в отличие от данных, полученных Халмурадовым и соавт. [6], происходило лишь частичное ингибирование процесса ADP-рибозилирования под влиянием Met-аргинина (табл. 2), что указывает на суще-

ствование других, кроме аргинина, акцепторных аминокислот в белках СМ. В этой связи интересно отметить, что при исследовании эндогенного ADP-рибозилирования и ADP-рибозилирования, индуцируемого холерным токсином, в лизированных синапсоматах электрического органа *Toxopoda* обнаруживается различный набор акцепторных белков [4], что свидетельствует о возможности существования, помимо аргинина, других аминокислотных остатков, к которым присоединяется ADP-рибозный фрагмент NAD. Полученные нами данные об ингибировании процесса ADP-рибозилирования в СМ под влиянием гистидина и цистеина (табл. 2) подтверждают правомочность этого предположения. Наряду с широко распространенной моно-ADP-рибозилтрансферазой, катализирующей модификацию остатков аргинина в белках [20—22], в животном организме обнаружен фермент, осуществляющий моно-ADP-рибозилирование модифицированного гистидина, так называемого дифтамида, фактора элонгации EF-2 [23, 24]. Установлено также, что коклюшный токсин катализирует реакцию ADP-рибозилирования за счет образования N-гликозидной связи между ADP-рибозой и остатками цистеина в трансдуцине, выделенном из наружных сегментов сетчатки быка [25]. На основании полученных нами результатов нельзя исключить, что в мозгу крыс также имеется активность ADP-рибозилтрансфераз, специфичных к гистидину и цистеину.

Резюмируя вышеизложенное, можно заключить, что ADP-рибозилирование в СМ является сложным многообразным процессом, в который, возможно, вовлекаются различные аминокислоты в акцепторных белках. Можно представить, что модификация определенных аминокислот, вызывая конформационные сдвиги в белке, отражается на способности других аминокислотных остатков акцептировать ADP-рибозу. Этим может быть обусловлено почти полное ингибирование процесса ADP-рибозилирования в СМ под влиянием цистеина. Снижение степени ингибирования включения меченой ADP-рибозы в белки СМ, наблюдаемое в отдельных случаях при их длительной инкубации с Met-аргинином (в присутствии тимидина) или гистидином (в отсутствие тимидина), вероятно, связано с тем, что при этом ADP-рибозилированию подвергается большее количество аминокислотных остатков. Наряду с этим, данные противоположного характера, проявляющиеся в экспериментах с цистеином в присутствии тимидина или глутаматом, добавленным без тимидина, указывают на то, что в условиях продолжительной инкубации конъюгаты этих аминокислот могут деградировать под влиянием ADP-рибозил-белок-лиазы.

ADP-рибозилирование, как уже отмечалось, протекает лишь при нарушении целостности синапсомата, поэтому вопрос о физиологической значимости этого процесса в нервных окончаниях приобретает ограниченный характер.

ADP-RIBOSYLATION IN SYNAPTIC MEMBRANES OF RAT BRAIN

A. V. HAROUTUNIAN, N. O. MOVSESYAN, L. B. BURNASYAN,
S. S. ERANYAN, and G. A. GEVORKYAN

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of Armenian SSR, Yerevan

The rate of ADP-ribosylation of proteins of synaptic membranes (SM) from rat cerebral cortex increases more than 15-fold when SM are stored for 20 hours at room temperature. The effect is not associated with any non-enzymatic incorporation of free ADP-ribose (that may be generated by NAD cleavage) in SM proteins. There is some evidence that SM contain alongside with mono-ADP-ribosyltransferase also poly(ADP-ribose) synthetase activity. In studies of monoADP-ribosylation of SM proteins we found that cysteine and histidine were more effective inhibitors of this process as compared with methyl-arginine. Correspondingly, we propose that all these amino acids may act as acceptors of [14 C]ADP-ribose in SM proteins.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ueda K., Hayashi O.—In: ADP-ribosylation reactions. Biology and Medicine (eds. O. Hayashi, K. Ueda), p. 551–572, Acad. Press, L.-N. Y., 1982.
2. Gual J. C., Pearson C. K. TIBS, v. 11, p. 171–175, 1986.
3. Завадский Т. М., Мартиани Д. О., Тапалаян А. С. Сообщ. АН СССР, т. 101, № 3, с. 685–688, 1981.
4. Lester H., Steer M. L., Michaelson D. M. J. Neurochem., v. 38, № 4, p. 1080–1086, 1982.
5. Mandel P.—In: ADP-ribosylation of proteins (eds. F. R. Althaus, H. Hilz, S. Shall), p. 2–9, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, N. Y.—Tokyo, 1985.
6. Фоменко А. Н., Халимурадов А. Г., Степаненко С. П., Пожарин С. В. Биол. мембраны, т. 3, № 2, с. 124–130, 1986.
7. Whittaker V. P. Biochem. J., v. 106, p. 412–417, 1968.
8. Abita J. P., Chicheportiche R., Schweitz H., Lazdunski M. Biochemistry, v. 16, № 9, p. 1838–1864, 1977.
9. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr R. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265–275, 1951.
10. Shuber F., Travo P. Eur. J. Biochem., v. 65, p. 247–255, 1975.
11. Gill J. C., Meren R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 75, p. 3050–3054, 1978.
12. Hilz H., Koch R., Fantek W., Klapproth K., Adametz P. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, v. 81, p. 3929–3933, 1984.
13. Roemer V., Lambrecht J., Kittler M., Hilz H., Hoppe-Seiler's Z. Physiol. Chem., v. 349, p. 109–112, 1968.
14. Richter C., Winterhalter K. H., Baumhuter S., Lotscher H. R., Moser B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 80, p. 3188–3192, 1983.
15. Honma H., Mandel P. J. Neurochem., v. 47, № 3, p. 972–975, 1986.
16. Snell C. R., Snell P. H., Richards C. D. J. Neurochem., v. 43, № 6, p. 1610–1615, 1984.
17. De Wolf M. J. S., Vitty P., Ambesi-Implombato F. S., Kohn L. D. J. Biol. Chem., v. 256, № 23, p. 12287–12296, 1981.
18. Мулявко Н. А., Халимурадов А. Г. Биохимия, т. 49, вып. 10, с. 1623–1627, 1984.

19. Lidner C., Hilz H. Biochem. J., v. 206, № 1, p. 61-65, 1982.
20. West R. E., Moss J. Biochemistry, v. 25, № 24, p. 8057-8062, 1986.
21. Tanigawa Y., Tsuchiya M., Imai Y., Shimoyama M. J. Biol. Chem., v. 259, № 3, p. 2022-2029, 1984.
22. Soman G., Mickelson J. R., Louis C. F., Grewes D. J. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 120, p. 973-980, 1984.
23. Lee H., Iglewski W. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 81, p. 2703-2707, 1984.
24. Iglewski W. J., Lee H., Muller P. FEBS Lett., v. 173, № 1, p. 113-118, 1984.
25. West R. E., Moss J., Vaughan M., Liu T., Liu T.-Y. J. Biol. Chem., v. 260, № 27, p. 14428-14430, 1985.

Поступила 3 VI 1988

Серотонинергическая система, питание и регуляция веса тела. Под ред. S. Nicolaidis, Изд. Academic Press, Лондон, Англия, 1987 г., 178с.

Serotonergic System, Feeding and Body Weight Regulation. Ed. by S. Nicolaidis, Academic Press, London, England, 1987, 178p.

В сборник включен ряд статей относительно серотонинергической системы, в том числе: «Нейрохимический механизм действия лекарств, модифицирующих питание через серотонинергическую систему», «Изменения в уровне серотонина и структура поведения человека», «Гастромоторные механизмы фенфлюраминовой анорексии», «Серотонинергические механизмы питания человека—фармакологические доказательства». В представленных статьях уделено внимание периферическим и центральным механизмам действия серотонинергических препаратов, регулирующих аппетит, эффекту дексфенфлюрамина на вес тела животных, механизму «аноректического и лептогенного эффектов» фенфлюрамина, являющегося агонистом серотонина. Предназначен для нейрохимиков, диетологов, специалистов по поведенческим реакциям.



УДК 577.352.46 и 577.352.335

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ ТРАНСПОРТНОЙ СИСТЕМЫ L-ГЛУТАМАТА ПРИ МОДИФИКАЦИИ МЕМБРАН СИНАПТОСОМ ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ

ЖАРИКОВА А. Д., ЖАРИКОВ С. И., БУДАНЦЕВ А. Ю., ЧЕРНЯВСКАЯ Л. И.

Институт биологической физики АН СССР, Пущино

*Институт химической физики АН СССР, Москва

Исследовали активность высокоаффинного Na^+ -зависимого транспорта $[^3\text{H}]$ глутаминовой кислоты ($[^3\text{H}]$ глутамата) в синапсомы, мембраны которых модифицировались олеиновой кислотой. Обнаружено, что олеиновая кислота вызывает зависимость от концентрации ингибирование Na^+ -зависимого транспорта $[^3\text{H}]$ глутамата по неконкурентному типу. Показано, что олеиновая кислота снижает микровязкость синаптических мембран и практически не изменяет их фосфолипидный состав. Анализ температурной зависимости ингибирующего действия олеиновой кислоты на транспорт $[^3\text{H}]$ глутамата с построением графиков Аррениуса также свидетельствует об измененном состоянии липидов синаптических мембран. На основании полученных результатов и данных литературы высказывается предположение, что при вызываемом олеиновой кислотой снижении микровязкости синаптических мембран происходит погружение в мембрану переносчика, транспортирующего L-глутамат, в результате чего уменьшается мембранного транспорта $[^3\text{H}]$ глутамата.

Пресинаптические мембраны терминалей глутаматергических нейронов содержат высокоаффинную Na^+ -зависимую транспортную систему захвата L-глутаминовой кислоты (глутамата), роль которой, по-видимому, заключается в устранении из синаптической щели основной доли высвобождающегося из нервных окончаний глутамата [1]. Движущими силами активного транспорта глутамата внутрь терминалей являются градиенты Na^+ (снаружи > внутри) и K^+ (внутри > снаружи) [2]. Имеющиеся данные позволяют считать, что транспортная система захвата глутамата (Глу-переносчик) включает белковый компонент [2, 3], функционирование которого зависит от окружающих его мембранных липидов. В частности, показано, что модификация липидной компоненты синаптических мембран фосфолипидами, фосфолипазами или ненасыщенными жирными кислотами вызывает изменения Na^+ -зависимого мембранного транспорта L-глутамата и других нейротрансмиттеров в синапсомы [4—9]. Обнаруженное свойство ненасыщенных жирных кислот, в том числе олеиновой, усиливать опосредуемое переносчиками высвобождение нейротрансмитте-

ров из синапсом и тормозить их обратный захват позволяет предполагать, что свободные ненасыщенные жирные кислоты являются эндогенными регуляторами транспорта нейротрансмиттеров через пресинаптические мембраны нервных окончаний [7—9].

Для правильной интерпретации механизмов регулирующего действия ненасыщенных жирных кислот на функционирование Глутереносчиков очень важно знать об их влиянии на различные характеристики обратного захвата глутамата в нервные окончания, в том числе на кинетику. Такие данные позволят сделать вывод о предпочтительном влиянии ненасыщенных жирных кислот на число функционирующих переносчиков или на их сродство к транспортируемому лиганду. В данной работе исследованы характеристики Na^+ -зависимого транспорта $[^3\text{H}]$ глутамата в синапсомы, выделенные из головного мозга крыс, и проанализированы изменения этих характеристик при модификации синаптических мембран олеиновой кислотой.

Материалы и методы

В работе использовали HEPES («Sigma», США), кристаллический бычий сывороточный альбумин (BSA, «Koch-Light Lab.», Англия), олеиновую кислоту («Serva», ФРГ), $[^{14}\text{C}]$ олеиновую кислоту с У. А. 1800 ГБК/моль (Ленинград), L-[$g\text{-}^3\text{H}$]-глутаминовую кислоту с У. А. 21 Ки/мМоль («Amersham», Англия). Остальные реактивы отечественного производства квалификации «х. ч.» и «ос. ч.».

Синапсомы выделяли из коры и подкорковых структур головного мозга крыс-самцов линии *Wistar* массой 140—150 г по методу Hajos [10]. Конечный осадок синапсом ресуспендировали в 0,32 М сахарозе (HEPES- NaOH -буфер, 10 мМ, pH 7,4) и хранили на холоде в течение всего эксперимента (не более 3 ч). Аликвоту 50 мкл суспензии синапсом, содержащей 200 мкг синапсомного белка, определенного по методу Lowry и соавт. [11], вносили в пробирки с инкубационной средой следующего состава (мМ): NaCl —132; KCl —5; MgCl_2 —1,3; NaH_2PO_4 —1,2; CaCl_2 —1,2; HEPES—10; глюкоза—10 (pH доводили до значения 7,4 трисом) и преинкубировали в течение 5 мин при 37°. В конце преинкубации в пробирки вносили $[^3\text{H}]$ глутамат ($9,5 \cdot 10^{-6}$ М, 0,05 мКи/мкл). Олеиновую кислоту, растворенную в 96%-ном этаноле и хранившуюся в атмосфере аргона, добавляли к синапсомам за 10 с до внесения $[^3\text{H}]$ глутамата. Во все контрольные пробы вносили эквивалентное количество 96%-ного этанола. Вносимые количества этанола не влияли на транспорт $[^3\text{H}]$ глутамата в синапсомы. После всех добавок конечный объем проб составлял 1 мл. В конце периода инкубации (0,5—15 мин) захват $[^3\text{H}]$ глутамата синапсомами останавливали методом фильтрования через мембранные фильтры («Millipore», США) с размером пор 0,65 мкм. Осадок синапсом на фильтре промывали 3 раза по 5 мл инкубационной среды. Радиоактивность с фильтров подсчитывали на счетчике «Intertech-

nique SL-4000» (Франция). Параллельно аналогичные эксперименты проводили в инкубационной среде, где NaCl был заменен эквивалентным количеством LiCl. Количество [^3H] глутамата, накопившегося в синапсосамах за счет Na^+ -зависимого механизма транспорта, рассчитывали как разность между значениями, полученными в присутствии и в отсутствие Na^+ .

При исследовании кинетики Na^+ -зависимого транспорта [^3H] глутамата в синапсосомы в отсутствие и присутствии олеиновой кислоты ($5 \times 10^{-5} \text{ M}$) концентрации [^3H] глутамата варьировали от $5 \cdot 10^{-6}$ до 10^{-4} M , время инкубации составляло 2 мин. Для получения температурной зависимости транспорта [^3H] глутамата и расчета величины энергии активации использовали концентрацию [^3H] глутамата $5 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, то есть в 3,3 раза большую, чем полученная в наших экспериментах величина K_m .

Интактность синапсосом в процессе инкубации с олеиновой кислотой контролировали по лактатдегидрогеназной активности [12]. Использованные концентрации олеиновой кислоты не оказывали детергентного действия на мембраны синапсосом. Достоверность экспериментальных данных оценивали по критерию Стьюдента. Расчет кинетических параметров транспорта [^3H] глутамата проводили на ЭВМ методом наименьших квадратов.

О включении олеиновой кислоты в синаптические мембраны судили по появлению радиоактивности в синапсосамах после инкубации их с [^{14}C] олеиновой кислотой. Микровязкость мембран синапсосом определяли методом спинных зондов с использованием иминоксильного радикала 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоил-1-оксилпиперидина, который преимущественно встраивается в липидную фазу мембраны [13]. Радиоспектроскопические измерения проводили на спектрометре E-4 («Varian»), используя суспензию синапсосом с концентрацией белка 5 мг/мл. Расчет спектров ЭПР производили по времени вращательной корреляции зонда (τ_c), позволяющему судить о микровязкости липидов мембран. Экстракцию липидов из синапсосом проводили по методу Блайя и Дайера в модификации Кейтса [14]. Фосфолипиды фракционировали методом одномерной восходящей хроматографии на силикагеле [15] с последующим количественным определением фосфолипидных фракций по неорганическому фосфору [16], а холестерина—по методу Sperry [17].

Результаты и обсуждение

Первоначально в экспериментах на синапсосамах, выделенных из коры и подкорковых структур головного мозга крыс, нами была проведена оценка скоростей Na^+ -зависимого и Na^+ -независимого транспорта [^3H] глутамата через синаптические мембраны. Установлено, что при начальной концентрации в инкубационной среде $9,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ накопление [^3H] глутамата в синапсосамах за счет активного Na^+ -зависимого механизма транспорта составляло 698 ± 19 пмоль/мг белка/5 мин, а за счет Na^+ -независимого механизма— 56 ± 5 пмоль/мг белка/5 мин. Таким образом, общее накопление [^3H] глутамата в синапсосамах, являющееся суммарным резуль-

татом вышеуказанных механизмов, равнялось 754 ± 18 пмоль/мг белка/5 мин. Количество [^3H]глутамата, накапливающегося в синапсосах за счет Na^+ -зависимого транспорта, линейно увеличивалось в течение первых 2-х мин инкубации и достигало своего максимума к 10-й мин (рис. 1, кривая 1).

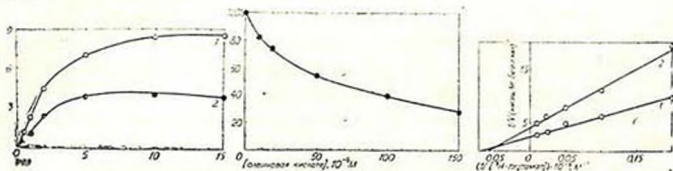


Рис. 1. Зависимость Na^+ -зависимого накопления [^3H]глутамата (пмоль $\times 10^{-2}$ /мг белка) внутри синапсосом от времени инкубации. 1—контроль; 2—при добавлении в инкубационную среду олеиновой кислоты ($5 \cdot 10^{-5}$ М). Здесь и на рис. 2, 3, 5 каждая точка представляет собой среднее значение 4—5 экспериментов, выполненных в трех параллельях

Рис. 2. Na^+ -зависимый транспорт [^3H]глутамата в синапсосомы: при наличии в инкубационной среде разных концентраций олеиновой кислоты (в % от контроля). Накопление [^3H]глутамата в контрольных синапсосах составляло 698 ± 19 пмоль/мг белка/5 мин

Рис. 3. Кинетика Na^+ -зависимого транспорта [^3H]глутамата в синапсосомы в контроле (1) и в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ олеиновой кислоты (2) в координатах Лайнуивера-Берка

При добавлении в инкубационную среду олеиновой кислоты происходило торможение Na^+ -зависимого транспорта [^3H]глутамата в синапсосомы (рис. 1, кривая 2). Ингибирующий эффект олеиновой кислоты возрастал с увеличением ее концентрации в среде (рис. 2). Полученные нами данные совпадают с результатами ранее проведенных исследований по влиянию ненасыщенных жирных кислот на транспорт аминокислотных нейротрансмиттеров [8, 9].

Кинетическое исследование Na^+ -зависимого транспорта [^3H]глутамата показало, что этот процесс подчиняется кинетике насыщения с $K_m = 1,5$ мкМ и $V = 402$ пмоль/мг белка/мин (рис. 3). При ингибировании транспорта [^3H]глутамата в присутствии олеиновой кислоты ($5 \cdot 10^{-5}$ М) происходило снижение V до 228 пмоль/мг белка/мин, а величина K_m практически не изменялась. Таким образом, нами установлено, что ингибирование транспорта [^3H]глутамата в синапсосомы, вызываемое олеиновой кислотой, осуществляется по неконкурентному типу с уменьшением числа функционирующих Глу-переносчиков и их взаимодействием сродством к L-глутамату.

Наблюдаемый нами ингибирующий эффект олеиновой кислоты не был обусловлен ее детергентным действием на мембраны синапсосом, так как вызывался даже относительно низкими концентрациями (10^{-7} М) и устранялся БСА, связывающим свободные жирные кислоты (рис. 4). Кроме того, под действием использованных концентраций олеиновой кислоты не происходило увеличения лактатдегидрогеназной активности в

суспензии синапсом, в отличие от препаратов, обработанных 0,1%-ным раствором Тритона X-100. Для того, чтобы ответить на вопрос, не связано ли ингибирующее действие олеиновой кислоты на захват $[^3\text{H}]$ глутамата синапсом с изменением физико-химических характеристик синаптических мембран, нами было изучено включение олеиновой кислоты в синапсомы, а также изменение микровязкости и фосфолипидного

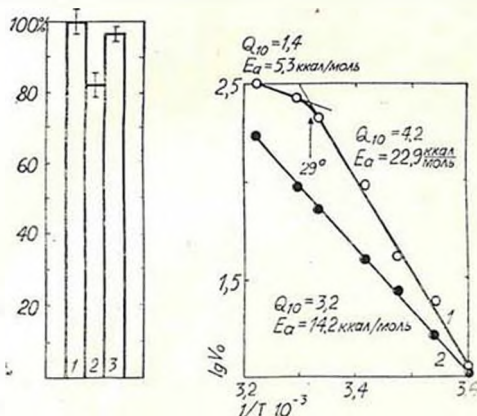


Рис. 4. Na^+ -зависимый транспорт $[^3\text{H}]$ глутамата в синапсомы в присутствии олеиновой кислоты и олеиновой кислоты + БСА (в %). 1—контроль (698 ± 19 пмоль/мг белка за 5 мин); 2—в присутствии олеиновой кислоты (10^{-5} M); 3—в присутствии олеиновой кислоты (10^{-5} M) + БСА (1 mg/ml)

Рис. 5. График Аррениуса для начальной скорости Na^+ -зависимого транспорта $[^3\text{H}]$ глутамата в синапсомы (в пмоль/мг белка/мин) в контроле (1) и в присутствии $5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$ олеиновой кислоты (2). Начальная концентрация $[^3\text{H}]$ глутамата в пробах— $5 \cdot 10^{-5}\text{ M}$

состава синаптических мембран. Показано, что $[^{14}\text{C}]$ олеиновая кислота связывается с синапсомами. БСА предотвращает это связывание, а L-глутамат несколько увеличивает его (табл. 1). Можно предполагать, что при связывании олеиновой кислоты с синапсомами происходит распределение ее в липидной фазе синаптических мембран [18] и изменение структуры последних. При этом, как обнаружено в наших экспериментах, относительное содержание основных мембранных фосфолипидов фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина и фосфатидилсерина практически не изменяется, но уменьшается относительное содержание фосфатидной кислоты и кардиолипина и увеличивается содержание монофосфатидилнозита (табл. 2). Несмотря на незначительные изменения фосфолипидного состава синаптических мембран под действием олеиновой кислоты ($5 \times 10^{-5}\text{ M}$) в условиях наших экспериментов зарегистрировано уменьшение микровязкости синаптических мембран. Показано, что время вращательной корреляции спинного зонда 2,2,6,6-тетраметил-4-каприлоил-

1-оксилпиперидина уменьшалось при 37° с $(1,38 \pm 0,07) \times 10^{-9}$ с до $(0,77 \pm 0,05) \times 10^{-9}$ с. При этом более жидкому состоянию синаптических мембран соответствовало незначительное увеличение содержания общих липидов в расчете на мг белка от $0,52 \pm 0,03$ до $0,59 \pm 0,03$, а содержание холестерина как на мг белка, так и на мкмоль фосфолипидов не изменялось (табл. 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях наших экспериментов, по-видимому, происходит неметаболическое включение олеиновой кислоты в состав синаптических мембран.

Таблица 1

Связывание [14 C]олеиновой кислоты с синапсосомами		
	% связывания [14 C] олеиновой кислоты с синапсосомами ^а	
	1	2
Контрольные синапсосомы (400 мкг белка/мл)	57	64
Синапсосомы + БСА (1 мг/мл)	15	13
Синапсосомы + L-глутамат (10^{-5} M)	68	71

Примечание. ^аЗа 100% принято количество [14 C]олеиновой кислоты, добавляемое в инкубационную среду с синапсосомами: 1— $4,62 \cdot 10^{-9}$ моль или 0,2 μ Ки, 2— $9,24 \cdot 10^{-9}$ моль или 0,4 μ Ки. Здесь и в табл. 2 и 3 состав инкубационной среды и условия инкубации те же, что при исследовании транспорта [3 H]глутамата в синапсосомы.

Таблица 2

Фосфолипидный состав (% от общего фосфора) мембран синапсосом головного мозга крыс в контроле и после инкубации с олеиновой кислотой

Фракция фосфолипидов	Контроль	Олеиновая кислота (5×10^{-5} M)
Сфингомиелин	$6,6 \pm 0,8$	$5,6 \pm 0,9$
Фосфатидилхолин	$32,8 \pm 2,5$	$32,5 \pm 2,5$
Фосфатидилацетилхолин	$30,4 \pm 3,8$	$32,6 \pm 3,5$
Фосфатидилсерин	$10,6 \pm 0,8$	$12,6 \pm 0,7$
Фосфатидилинозит	$3,9 \pm 0,5$	$6,4 \pm 0,6$
Фосфатидная кислота	$8,5 \pm 0,9$	$5,9 \pm 0,6$
Кардиолипин	$7,2 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,8$

Согласно разработанной Клауспег и соавт. [18] модели взаимодействия свободных жирных кислот с клеточными мембранами, олеиновая кислота, как и другие цис-ненасыщенные жирные кислоты, распределяется в более жидких доменах мембран, в то время как ненасыщенные и транс-ненасыщенные жирные кислоты—в более твердых доменах. Указанная модель, а также отсутствие выраженного эффекта насыщенных жирных кислот на Na^+ -зависимый транспорт нейротрансмиттеров в синапсосомы [19] позволяют допустить преимущественную локализацию Глутереносчика в более жидких доменах мембранных липидов.

О том, что снижение функциональной активности транспортной системы L-глутамата, вызываемое олеиновой кислотой, связано с изменением состояния липидной компоненты синаптических мембран, свидетельствуют также полученные нами данные о различии температурной зависимости транспорта $[^3\text{H}]$ глутамата в контрольных синаптосомах и модифицированных олеиновой кислотой. График Аррениуса для скорости транспорта $[^3\text{H}]$ глутамата в контрольные синаптосомы имеет точку перегиба при 29° (рис. 5). В пределах температур $37-29^\circ$ и $29-5^\circ$ процесс транспорта $[^3\text{H}]$ глутамата характеризуется энергиями активации (E_A) 5,3 и

Таблица 3

Содержание холестерина в контрольных синаптосомах и модифицированных олеиновой кислотой

	Контроль	Олеиновая кислота (5×10^{-3} M)
Холестерин, мг/мл	2,2	1,9
Холестерин, мг белок, мг	0,12	0,12
Холестерин, мкМ фосфолипиды, мкМ	0,51	0,43

22,9 ккал/моль соответственно. Скорость Na^+ -зависимого транспорта $[^3\text{H}]$ глутамата в этих интервалах температур линейно уменьшается при понижении температуры с коэффициентами Q_{10} , равными 1,4 и 4,2 соответственно. В отличие от контрольных синаптосом, график Аррениуса для скорости транспорта $[^3\text{H}]$ глутамата в синаптосомах, модифицированных олеиновой кислотой, не имеет точки перегиба ($Q_{10}=3,2$). Энергия активации процесса транспорта $[^3\text{H}]$ глутамата в этом случае на всем интервале температур имеет одинаковую величину $E_A = 14,2$ ккал/моль. Наличие точки перегиба на графике Аррениуса для контрольных синаптосом может быть связано с переходом от одного скоростьлимитирующего этапа в транспорте $[^3\text{H}]$ глутамата к другому с более высокой энергией активации. Такой переход может быть обусловлен влиянием понижения температуры на основные метаболические процессы внутри синаптосом, а также изменением четвертичной структуры белков, участвующих в транспорте $[^3\text{H}]$ глутамата через синаптические мембраны. Последнее может происходить в результате влияния общего или локального увеличения ригидности мембранных липидов. Олеиновая кислота, встраиваясь в липидную компоненту синаптических мембран, увеличивает ее ненасыщенность. При этом сглаживаются фазовые переходы липидов и изменение величины энергии активации отодвигается в зону более низких температур.

Таким образом, модификация мембран синаптосом олеиновой кислотой в наших экспериментах сопровождается уменьшением микровязкости синаптических мембран и функциональной активности Na^+ -зависимого транспорта $[^3\text{H}]$ глутамата в синаптосомах. Согласно данным Shinitzky и соавт. [20], изменение микровязкости клеточных мембран приводит к вер-

тикальному перемещению интегральных мембранных белков. Показано, что при увеличении текучести клеточных мембран наблюдается уменьшение латерального сжатия интегральных белков мембранными липидами и погружение белков в мембраны. Учитывая эти данные и полученные нами результаты об уменьшении числа функционирующих Глу-переносчиков в синаптических мембранах, модифицированных олеиновой кислотой, мы пришли к выводу, что при возникающем увеличении текучести синаптических мембран происходит погружение в мембрану Глу-переносчика или одной из его субъединиц. Это предположение согласуется с данными Nort и Fleischer [21], которые показали, что при снижении микровязкости синаптических мембран наблюдается уменьшение числа Na^+ -зависимых $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ связывающих участков, относящихся к ГАМК-транспортующей системе.

В заключение необходимо отметить, что мембранотропное действие олеиновой кислоты, как известно, проявляется не только в уменьшении микровязкости синаптических мембран, но и в увеличении отрицательного поверхностного потенциала и уменьшении трансмембранного потенциала синапсом [9, 22]. О причинной связи этих эффектов олеиновой кислоты с ингибированием транспорта $[^3\text{H}]\text{глутамата}$ в синапсомы можно сказать следующее. Увеличение отрицательного поверхностного потенциала синапсом под действием олеиновой кислоты не может являться основной причиной изменения транспорта $[^3\text{H}]\text{глутамата}$, так как показано, что насыщенные жирные кислоты (пальмитиновая, стеариновая), также увеличивающие отрицательный поверхностный потенциал синапсом, практически не влияют на транспорт аминокислотных нейротрансмиттеров [8, 9]. Далее известно, что деполяризация синапсом сопровождается уменьшением обратного захвата нейротрансмиттеров [1, 9]. Однако анализ имеющихся в литературе данных [9, 21] позволяет предполагать, что снижение трансмембранного потенциала синапсом, модифицированных олеиновой кислотой, происходит независимо от уменьшения микровязкости синаптических мембран, вероятно, вследствие протонофорных свойств олеиновой кислоты [23—25]. Кроме того, установлено, что изменение микровязкости синаптических мембран без сопутствующего уменьшения трансмембранного потенциала синапсом может нарушать транспорт нейротрансмиттеров. Так, было показано, что увеличение или уменьшение соотношения холестерина/фосфолипиды в синаптических мембранах влияет на захват $[^3\text{H}]\text{ГАМК}$ в синаптические мембранные везикулы, но не отражается на их мембранном потенциале и Na^+ -проницаемости [21]. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что функциональная активность транспортной системы L-глутамата зависит от структурного состояния липидов синаптических мембран, тем самым подтверждая важную роль мембранных липидов в транспорте нейротрансмиттеров через мембраны пресинаптических окончаний.

FUNCTIONAL ACTIVITY OF L-GLUTAMATE TRANSPORT SYSTEM AFTER MODIFICATION OF SYNAPTOSOMAL MEMBRANES BY OLEIC ACID

A. D. ZHARIKOVA, S. I. ZHARIKOV, A. Yu. BUDANTSEV
and L. CHERNYAVSKAYA*

Institute of Biological Physics, USSR Academy of Sciences, Pushchino and
*Institute of Chemical Physics, USSR Academy of Sciences, Moscow

We studied the activity of the high-affinity Na-dependent transport of ^3H -L-glutamic acid through synaptosomal membranes modified by oleic acid treatment. Oleic acid induced concentration-dependent non-competitive inhibition of ^3H -L-glutamic acid transport into synaptosomes. The effect of oleic acid could be eliminated by bovine serum albumin. Analysis of the temperature dependence of oleic acid-induced inhibition of ^3H -L-glutamate transport shows that oleic acid modifies the phase state of lipids in synaptosomal membranes. We propose that decreased microviscosity of synaptosomal membranes induced by oleic acid results in the immersion of the L-glutamate carrier (or one of its subunits) into the membrane.

ЛИТЕРАТУРА

1. Iversen L. L. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 41, p. 571-579, 1971.
2. Kanner B. J., Sharon J. *FEBS Lett.*, v. 94, p. 245-248, 1978.
3. Radlan R., Kanner B. J. *J. Biol. Chem.*, v. 260, p. 11859-11865, 1985.
4. Church A. Y., Leslie S. W. *J. Neurochem.*, v. 38, p. 691-695, 1982.
5. De Medio G. E., Hamburger A., Sellstrom A., Porcellati G. *Neurochem. Res.*, v. 2, p. 469-484, 1977.
6. Rotman A. J. *J. Neurochem.*, v. 22, p. 1369-1372, 1977.
7. Chan P. H., Kerlan R., Fishman R. A. *J. Neurochem.*, v. 40, p. 309-316, 1983.
8. Rhoads D. E., Ockner R. K., Peterson N. A., Radhupathy E. *Biochemistry*, v. 22, p. 1965-1970, 1983.
9. Troeger M. B., Rafalowska U., Erecinska M. *J. Neurochem.*, v. 42, p. 1735-1742, 1984.
10. Hajos F. *Brain Res.*, v. 93, p. 485-489, 1975.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265-275, 1951.
12. Fiszler S., De Robertis E. *Brain Res.*, v. 5, p. 31-44, 1967.
13. Голоушанов А. Н., Бурлакова Е. Б. *Биофизика*, т. 20, с. 816-820, 1975.
14. Кэйтс М. *Техника липидологии*, с. 72-77. М., Мир, 1975.
15. Шталя Э. *Хроматография в тонких слоях*, с. 44-60, М., Мир, 1965.
16. Chen P. S., Forisfar T. J., Warner H. *Anal. Chem.*, v. 28, p. 1756-1158, 1956.
17. Sperry W. H., Webb M. *J. Biol. Chem.*, v. 187, p. 96-105, 1950.
18. Klausner R. D., Kleinfeld A. M., Hoover R. L., Karnovsky M. J. *J. Biol. Chem.*, v. 255, p. 1286-1295, 1980.
19. Rhoads D. E., Kaplan M. A., Peterson N. A., Radhupathy E. *J. Neurochem.*, v. 38, p. 1255-1260, 1982.
20. Shinitzky M.—In: *Physiology of membrane fluidity*. Boca Raton: CRC Press, INC, v. 1, p. 1-51, 1984.

21. North P., Fletscher S. J. Biol. Chem., v. 258, p. 1242—1253, 1983.
22. Брусованич В. И., Епин А. Н., Селищева А. А., Горбунов Н. В., Тюрин В. А., Прилипко А. А., Катан В. Е. Нейрохимия, т. 5, с. 3—10, 1986.
23. Антонов В. Ф., Иванов А. С., Корепанова Е. А., Осин И. С., Петров В. В., Трухманова К. И. Свободно-радикальное окисление липидов в норме и при патологии, с. 5—9, М., 1976.
24. Heaton G. M., Nicholls D. G. J. Biochem., v. 67, p. 511—517, 1976.
25. Кочергинский Н. В., Осака И. С., Дезюшкин В. В., Рубайло В. А. Бюл. мембраны, т. 4, № 8, с. 838—848, с. 1987.

Поступила 12 VII 1988

Астроциты т. 3. Клеточная биология и патология астроцитов, трех-томное издание под ред. S. Fedoroff, A. Vernadakis, Academic Press, Англия, 1986, 460с.

Astrocytes. Ed. by S. Fedoroff, A. Vernadakis, Academic Press, London, England, Three-volumest, v. 3, Cell. Biology and Pathology of Astrocytes, 1986, 460p.

В этом томе многотомного издания опубликованы статьи, в которых рассматриваются электрофизиологические свойства астроцитов, особенности ионных каналов глияльных клеток, рецепторы и циклические нуклеотиды клеточных культур астроглии, захват катехоламинов, серотонина и аминокислот астроцитами. Подробно рассматриваются механизмы обеспечения холином глияльных клеток, роль астроцитов в компартментализации аминокислот, ферментативная индукция и регуляция синтеза белков, распределение и регуляция уровня ионов водорода в астроцитах. Уделено внимание липидам астроцитов и их обмену, взаимоотношениям нейронов с глией, вкладу клеток астроглии в процессы выживания нейронов и роста нейритов. В книге нашла также отражение проблема возрастных изменений в астроцитах. Предназначено для специалистов по нейронаукам.



УДК 577.112:577.152

ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА КОРОНАРОСУЖИВАЮЩИХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ ГИПОТАЛАМУСА

ГАЛОЯН А. А., БАРХУДАРЯН Н. А., ВАЛКО К.,
ЗАКАРЯН Т. Р.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Центральный исследовательский институт химии АН ВНР, Будапешт

Используя гель-фильтрацию на сфадексе G-10, ИОХ на Дауэксе 50 W X 8, препаративную и аналитическую ВЭЖХ в обращенной фазе, из гипоталамуса крупного рогатого скота выделены в гомогенном виде 5 коронаросуживающих гликопептидных фактора. Как кислотный, так и ферментативный гидролиз (трипсин, химотрипсин, калесин В (К.Ф. 3.4.22.1) приводили к потере ими коронаросуживающей активности.

В 1962 г. в гипоталамусе крупного рогатого скота были обнаружены 2 кардиотропных нейрогормона [1], оказывающие противоположное действие на коронарное кровообращение (коронарорасширяющее и коронаросуживающее). Впоследствии была открыта группа коронарорасширяющих нейропептидов, условно обозначенных нейрогормонами «С», «К», «Г» [2—3], изучены их физико-химические и биологические свойства и показано, что они существуют в виде множественных форм [4]. Установлено, что эти нейропептиды являются метаболически активными соединениями [5—9], действующими также и на обмен циклических нуклеотидов.

В нашей лаборатории накоплен большой фактический материал, свидетельствующий о наличии в гипоталамусе крупного рогатого скота целого ряда коронаросуживающих соединений. Однако до сих пор мало изучена их химическая природа. Поэтому представляло интерес выделить и идентифицировать коронаросуживающие соединения гипоталамуса.

В настоящей работе представлены данные о выделении и характеристике пептидных факторов гипоталамуса, которые при внутривенном введении кошкам в условиях *in situ* вызывали заметное снижение объемной емкости крови, оттекающей от венозных сосудов сердца.

Материалы и методы

Кардиотропные соединения выделяли из уксуснокислого экстракта гипоталамуса по методу Галояна и соавт. [10]. Дальнейшую очистку про-

водили, используя гель-фильтрацию на сефадексе G-10 и ИОХ на Дауэксе 50 W×8 по ранее описанной схеме [11].

ВЭЖХ пептидов проводили: 1) на колонке Lichrosorb RP-8 (1.6×25 см, диаметр частиц 7 мкм; «Knauer», ФРГ), с использованием ступенчатого градиента ацетонитрила в 0,1%-ной CF_3COOH (время изменения градиента—1,5 ч), скорость элюции 3 мл/мин; 2) на колонке Nucleosil C₁₈ (0,46×25 см, диаметр частиц 7 мкм; «Macherey-Nagel», ФРГ), используя градиент концентрации ацетонитрила от 5 до 60% в 0,1%-ной CF_3COOH (время изменения градиента—1 ч), скорость элюции—1 мл/мин. Пептиды детектировали при 220 нм.

Аминокислотный анализ пептидов проводили после кислотного гидролиза (5,7 н. HCl, 110°, 24 ч) на аминокислотном анализаторе D-500 («Durrum», США).

N-концевые аминокислоты определяли по методу Gray [12]. DNS-производные аминокислот идентифицировали двумерной ТСХ на пластинках с закрепленным слоем силикагеля (5×5 см) [13] или на полиамидных пластинках (3×3 см) [14].

Наличие углеводного компонента в составе исследуемых пептидов определяли по методу Кнапп [15]; *n*-нитробензоатные производные пептидов идентифицировали ТСХ на пластинках «Силуфол UV-254» («Kawallieg», ЧССР) в системе бензол:этилацетат (10:1).

Катепсин В (К.Ф. 3.4.22.1) выделяли по ранее описанному методу [16]. Гидролиз пептидов катепсином В проводили в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,0, содержащем 2 мМ дитиотрейтол и 2 мМ ЭДТА при 37° в течение 4 ч и соотношении фермент/субстрат 1:10.

Гидролиз трипсином и химотрипсином проводили в 0,1 М аммонийбикарбонатном буфере, pH 8,1 при 37° в течение 4 ч и фермент/субстратном соотношении 1:10.

Количество белка определяли по методу Lowry и соавт. [17].

ТСХ ферментативных гидролизатов проводили на пластинках силикагеля («Merk», ФРГ) (9×12 см) в системе: *n*-бутанол-пиридин-уксусная кислота-вода (15:10:3:12). Хроматограммы проявляли 0,2%-ным раствором нингидрина в ацетоне.

Биологическое тестирование проводили в условиях *in situ* на кошках под урстановым наркозом.

В работе использованы следующие реактивы: трипсин, химотрипсин («Worthington», США), дитиотрейтол, ЭДТА («Sigma», США), ацетонитрил 'Дауэкс 50 W x8 («Merk», ФРГ), дансилхлорид, сефадекс G-10, сефадекс G-75, CM-сефадекс C-50 («Pharmacia», Швеция), *n*-нитробензоилхлорид предоставлен сотрудником нашей лаборатории Я. В. Возным, остальные реактивы марок х. ч. и ос. ч. («Союзхимреактив», СССР).

Результаты и обсуждение

Очистку кардиотропных пептидных факторов (ПФ) проводили, как описано ранее [11], с той лишь разницей, что вместо стадии ВЭЖХ в обращенной фазе на колонке Nucleosil C₁₈ (1,0×25 см, диаметр частиц

7 мкм) с применением изократического разделения раствором 50%-ного ацетонитрила в 0,1%-ной CF_3COOH , были проведены последовательно полупрепаративное и аналитическое разделение методом ВЭЖХ в обращенной фазе пептидной фракции гипоталамуса после ИОХ на Дауэксе 50W $\times$ 8. Полупрепаративное разделение было проведено на колонке Lichrosorb RP-8 (1,6 $\times$ 25 см) с использованием ступенчатого градиента ацетонитрила в 0,1%-ной CF_3COOH (рис. 1). В результате этого разде-

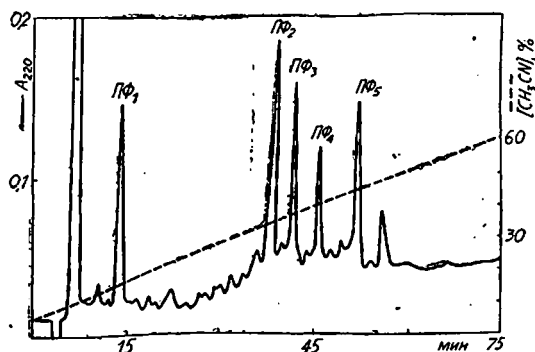
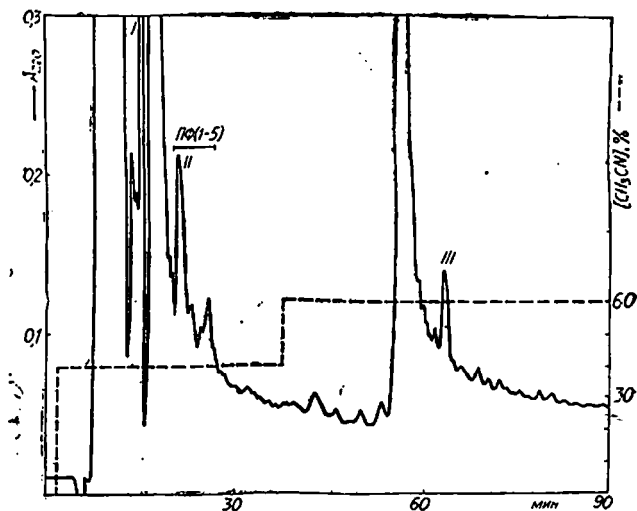


Рис. 1. ВЭЖХ биологически активной пептидной фракции после ИОХ на Дауэксе 50W $\times$ 8 на колонке Lichrosorb RP-8 (1,6 $\times$ 25 см), с использованием ступенчатого градиента ацетонитрила (пунктир) в 0,1% CF_3COOH .

Скорость элюции 3 мл/мин

Рис. 2. Рекроматография фракции II (см. рис. 1), содержащей смесь коронаросуживающих пептидных факторов на колонке Nucleosil C₁₈ (0,46 $\times$ 25 см), с использованием градиента концентрации ацетонитрила (5–60%) в 0,1% CF_3COOH . Скорость элюции 1 мл/мин.

ления в 3-х из полученных фракций была обнаружена биологическая активность. Фракции I и III (время удерживания 13,8 и 62,8 мин соответственно) обладали четко выраженным коронарорасширяющим свойством. Дальнейшему исследованию была подвергнута фракция II, в которой обнаружилась коронаросуживающая активность. Как видно из рис. 1, она представляла собой смесь нескольких соединений (время удерживания их 20,8; 22,7; 25,2 мин соответственно). Эта фракция была лиофилизована и подвергнута хроматографии на колонке Nucleosil C₁₈ (0,46×25 см) с применением градиента концентрации ацетонитрила (5—60%) и 0,1%-ной CF₃COOH (рис. 2). В результате были получены 5 кардиотропных пептидных факторов (время удерживания их 14; 38,8; 42; 46,2; 52,2 мин соответственно). Наиболее выраженной биологической активностью обладали три из них—ПФ₂, ПФ₃ и ПФ₄, которые при внутривенном введении кошкам в условиях *in situ* вызывали значительное снижение объемной емкости крови, оттекающей от венозных сосудов сердца по сравнению с нормой.

Гомогенность выделенных пептидных факторов определяли с помощью ТСХ их дансильрованных производных. Было показано, что N-концевой аминокислотой для ПФ_(1-3,4) является валин, для ПФ₂—глицина, а для ПФ₅—пролин.

Результаты изучения аминокислотного состава выделенных пептидных факторов показали, что по аминокислотному составу ПФ₍₁₋₄₎ обладали сходством. Для них характерны высокое содержание серина, глицина, глутаминовой кислоты, составляющее от 34% до 53% от общей суммы остатков. Для ПФ₅, помимо высокого содержания серина, глицина и глутаминовой кислоты, характерно наибольшее по сравнению с ПФ₍₁₋₄₎ содержание аргинина (таблица), а также наличие в его составе неидентифицированного соединения основного характера.

Таблица

Аминокислотный состав коронаросуживающих пептидных факторов (ПФ) (1—5) гипоталамуса крупного рогатого скота (в ммоль/мкг пептида)

Аминокислота	ПФ ₁	ПФ ₂	ПФ ₃	ПФ ₄	ПФ ₅
Asp	0,38	1,04	0,37	0,33	0,72
Thr	0,15	0,14	0,14	—	0,58
Ser	0,53	0,51	0,67	1,07	1,96
Glu	0,38	0,77	0,51	0,57	1,87
Pro	0,22	—	0,17	0,27	0,39
Gly	0,48	0,70	0,73	0,66	1,82
Ala	0,26	0,46	0,34	0,47	0,97
Val	0,28	0,39	0,31	0,21	0,31
Ile	0,15	0,11	—	0,14	0,28
Leu	0,17	0,18	0,35	0,13	0,45
Tyr	0,14	—	—	0,14	0,32
Phe	0,19	—	—	0,17	—
His	—	—	—	—	0,25
Lys	0,14	0,14	0,16	0,14	0,17
Arg	0,18	0,18	0,19	0,16	0,44

Примечание. Cys, Met, Trp не определяли.

Величина M_r выделенных пептидных факторов, скорректированная по данным аминокислотного состава, равна для ПФ₁ ≈ 3 кД, ПФ₍₂₋₄₎ ≈ 3.5 кД, а ПФ₅ ≈ 7 кД.

Кислотный гидролиз полученных кардиотропных пептидных факторов (5.7 н.НСl при 110° в течение 18 ч) приводил к потере биологической активности.

При изучении действия ряда протеолитических ферментов (трипсин, химотрипсин и катепсин В) на коронаросуживающие пептидные факторы оказалось, что уже после 4-х часовой инкубации при 37° и соотношении фермент/субстрат 1:10 наблюдалось исчезновение коронаросуживающей активности. Исследование ферментативных гидролизатов вышеуказанных нейропептидов обнаружило появление новых неидентифицированных продуктов при ТСХ на пластинках силикагеля.

Все пять пептидных факторов имели положительную реакцию с п-нитробензоилхлоридом, приводящую к образованию ультрафиолетпоглощающих пятен с R_f от 0.71 до 0.76 при ТСХ на пластинках Силуфол, что свидетельствовало о наличии углеводного компонента в их составе.

Таким образом, из гипоталамуса крупного рогатого скота выделены в гомогенном виде 5 кардиотропных гликопептидных факторов. Изучен их аминокислотный состав, определены N-концевые аминокислоты.

Интересными, на наш взгляд, представляются данные относительно действия внутриклеточной цистеиновой протеиназы—катепсина В—на выделенные нейропептиды, в результате чего происходит потеря ими коронаросуживающей активности. Ранее нами были получены данные относительно участия высокомолекулярной аспартильной протеиназы, сходной по своим свойствам с катепсином Д [18] в образовании коронарорасширяющего фрагмента из инертного белка-носителя нейрого르몬а «С» [19]. Эти данные позволяют предположить, что внутриклеточные протеиназы и в условиях *in vivo* участвуют как в процессинге, так и в деградации кардиотропных нейропептидов.

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF HYPOTHALAMIC CORONARO-CONSTRICTORY PEPTIDE FACTORS

A. A. GALOYAN, N. A. BARKHUDARYAN, K. VALKO*, T. R. ZAKARYAN,

Institute of Biochemistry, Armenian Academy of Sciences, Yerevan,

*Central Research Institute for Chemistry, Hungarian Academy of Sciences, Budapest

Five coronaroconstrictory glycopeptides were isolated from bovine hypothalamus by gel-filtration on Sephadex G-10, ion-exchange chromatography on Dowex 50Wx8, semipreparative and analytical reverse-phase high-performance liquid chromatography. Acid or enzymatic digestion (trypsin, chymotrypsin, cathepsin B (E.C. 3.4.22.1) resulted in the loss of coronaroconstrictory activity of these peptides.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 34, с. 109—111, 1962.
2. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга Ереван, Изд-во АН АрмССР, т. 3, с. 291—311, 1967.
3. Галоян А. А., Алексанян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 58, с. 133—186, 1974.
4. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Абелян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян Л. А., Одабашян А. Б., Бочко Н. Ф., Нейрохимия, т. 5, № 4, с. 354—365, 1986.
5. Галоян А. А., Гурвич Б. Я., Полюсян М. А. Вopr. биохимии мозга, Ереван, Изд-во АН АрмССР, т. 11, с. 89—97, 1976.
6. Галоян А. А., Алексанян С. С., Абелян Ж. Г., Бархударян Н. А. Докл. АН АрмССР, т. 2, с. 117—120, 1975.
7. Галоян А. А., Чифликян М. Д., Мурадян М. Ш., Едигарян А. К., Абрамян С. С., Нейрохимия, т. 5, № 1, с. 45—49, 1986.
8. Парсаданян Г. К., Абелян Ж. Г., Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 66, с. 164—167, 1978.
9. Галоян А. А. Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 3—9, 1987.
10. Галоян А. А., Алексанян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 37, с. 157—160, 1963.
11. Бархударян Н. А., Серабян С. С., Алексанян С. С., Захарян Т. Р., Мурадян М. Ш., Галоян А. А. Тезисы докл. X Всесоюз. конф. по биохимии нервной системы «Фундаментальные достижения нейрoхимии медицины» (под редакцией С. Е. Савирина), с. 70, Горький, 1987.
12. Gray W. R.—In: Methods in Enzymology (Ed. Hors C. H. W.), № 11, p. 137—151, N. Y.—L. Acad Press, 1967.
13. Бельский Б. Г., Ганкина Э. С., Нестеров В. В. Докл. АН СССР, № 1, с. 91—93, 1967.
14. Woods K. R., Wong K. T. Biochim et biophys. acta, v. 133, № 2, p. 369—370, 1967.
15. Knapp D. R. Handbook of Analytical derivatization reactions, p. 559—560, 1979.
16. Galoyan A. A., Azaryan A. V., Barkhudaryan N. A. Regulation of transmitter function Proc. 5 th—Meeting Eur. Soc. Neurochem. (ed. Vizi and Magyar), p. 229—236, 1984.
17. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Farr L. A., Roundall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
18. Бархударян Н. А., Азарян А. В. Нейрохимия, т. 2, № 3, с. 280—287, 1983.
19. Galoyan A. Neurochem. Res., v. 11, № 6, p. 769—789, 1986.

Поступила 25. IV 1988



УДК 575.1-577.15

ОСОБЕННОСТИ МАО МОЗГА КРЫС С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К РАЗВИТИЮ КАТАЛЕПСИИ

ПОПОВА Н. К., ВОЙТЕНКО Н. Н., КОЛПАКОВ В. Г., АЛЕХИНА Т. А.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

У предрасположенных к катаlepsии крыс наблюдали повышенную активность дезаминирующих бензиламин и дофамин МАО в стволе головного мозга и в полушариях, включающих полосатое тело, в то время как активность дезаминирующей серотонин МАО у этих животных была существенно пониженной только в полушариях. Предрасположенные к катаlepsии крысы отличались от контрольных более высокой V при дезаминировании как бензиламина, так и дофамина в стволе мозга и в полушариях.

Не вызывает сомнения, что в регуляции уровня биогенных аминов в мозгу важную роль играет МАО (моноамин: O_2 оксидоредуктаза К.Ф. 1.4.3.4, МАО). Наиболее существенное участие МАО в регуляции функциональной активности нейромедиаторных систем следует ожидать в случаях, когда окислительное дезаминирование представляет основной, как, например, для серотонина [1] или один из основных, как для дофамина [2], путь катаболизма медиатора. Хотя имеются данные о множественности МАО [3], пока установлено существование двух ее форм, различающихся структурой [4], субстратной и ингибиторной специфичностью [5, 6], МАО типа А и МАО типа В. В мозгу крыс, как и в мозгу человека, серотонин является специфическим субстратом МАО типа А, дофамин же дезаминируется обеими формами МАО [7].

В настоящее время появляются сведения об изменении активности МАО в мозгу больных такими наследственными заболеваниями, как болезнь Альцгеймера [8], болезнь Хантингтона [9] и шизофрения [10, 11]. Однако при огромном интересе к этим данным, исследование роли МАО в психопатологии и патологических формах поведения резко ограничено невозможностью прижизненного исследования мозга человека и практически отсутствием экспериментальных моделей наследственно закрепленных патологических форм поведения.

В Институте цитологии и генетики СО АН СССР селекционирована [12, 13] линия крыс с резко выраженной предрасположенностью к развитию катаlepsии, которая является одним из синдромов шизофрении. Ка-

телесию связывают с ослаблением дофаминергических влияний стриатопаллидарной системы [14], а нами было установлено [15] участие и серотониновой системы, проявлявшееся в повышении в стриатуме активности ключевого фермента в синтезе серотонина—триптофангидроксилазы. Изменяются ли при этой патологической форме поведения МАО, катализирующие окислительное дезаминирование как дофамина, так и серотонина, оставалось невыясненным.

Целью настоящего исследования явилось изучение активности МАО типа А и В и кинетики реакции дезаминирования серотонина, дофамина и бензиламина, специфического субстрата МАО типа В, в мозгу у генетически предрасположенных к катаlepsии крыс по сравнению с крысами аутбредной линии *Wistar*, из которой были селекционированы крысы «катаlepsтики».

Материалы и методы

Опыты проводили на аутбредных крысах линии *Wistar* массой 220—250 г, а также крысах той же линии, предварительно прошедших 20—21 поколение направленной селекции на высокую выраженность «спонтанной» катаlepsии [16], в возрасте 4 месяцев. Все крысы имели свободный доступ к корму и воде. Положительной пробой на катаlepsию считали ту, когда с первой попытки животное принимало насильственно приданную позу и поддерживало ее не менее 10 с. Животных, давших положительную пробу на катаlepsию не менее трех раз, считали предрасположенными к катаlepsии.

Крыс декапитировали. Выделенные на холоду ствол и полушария, включающие стриатум, гомогенизировали в стеклянных гомогенизаторах в 9 объемах 0,32 М сахарозы [17]. Неразделенную фракцию митохондрий (P_2) получали методом дифференциального центрифугирования гомогената в центрифуге К-24 и хранили при -20° до определения активности МАО.

Инкубацию полученных препаратов митохондрий проводили в течение 30 мин в 0,1 М Na^+ , K^+ -фосфатном буфере pH 7,4 при 37° [18] и свободном доступе воздуха. В качестве субстрата МАО использовали серотонин, бензиламин, дофамин. По начальным скоростям (v) реакции при пяти концентрациях субстрата: 0,0625; 0,125; 0,250; 0,500; 1,00 мМ рассчитывали K_m и V [19]. Активность МАО выражена в нмоль аммиака, образованного при дезаминировании субстрата/1 мг белка за 1 мин. Содержание аммиака, образованного при дезаминировании субстрата в процессе инкубации, определяли методом изотермической отгонки в модификации Силаковой и соавт. [20] с последующей нesslerизацией и измерением оптической плотности при 410 нм на СФ-26. Белок определяли по методу Lowry. Соотношение форм МАО типа А и В определяли по кривой Джонстона [5] с тирамином (2 мМ) в качестве субстрата при нескольких концентрациях хлоргидина.

Результаты исследований

Были установлены существенные изменения в активности МАО мозга крыс с выраженной наследственно закрепленной предрасположенностью

к каталепсии (табл. 1), в большей степени затронувшие МАО типа Б. Дезаминирующая бензиламин активность МАО в стволе мозга увеличилась в 1,5 раза, вдвое повысилась и активность МАО, дезаминирующей дофамина. Изменений в дезаминировании серотонина, специфического субстрата МАО типа А [7], в стволе мозга не обнаружено. Соответственно отношение МАО типа Б/МАО типа А в стволе мозга увеличилось на 40%. Поскольку окислительное дезаминирование дофамина осуществляется обеими формами МАО, значительное усиление дофаминдезаминирующей активности МАО в стволе мозга, очевидно, связано с увеличением активности МАО типа Б.

Сходные, хотя и менее выраженные изменения были отмечены в активности МАО типа Б, дезаминирующей бензиламин, а также в дофаминдезаминирующей активности МАО в полушариях мозга крыс, генетически предрасположенных к развитию каталепсии. Однако у крыс «каталептиков» в полушариях было отмечено небольшое, но достоверное понижение дезаминирующей серотонин активности МАО.

Отношение активности МАО типа А к МАО типа Б в полушариях мозга было также определено по высоте зоны плато в двухфазной кривой ингибирования дезаминирования тирамина хлоргилином (рисунок). Хлорги-

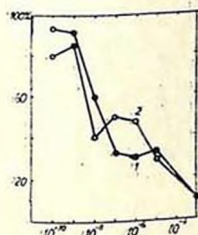


Рис. Влияние предрасположенности крыс к каталепсии на ингибирование дезаминирования тирамина хлоргилином в полушариях мозга контрольных (1) и предрасположенных к каталепсии крыс (2). Каждая точка представлена посредством определения активности МАО в гомогенате мозга 14 крыс и выражена как % оставшейся активности МАО после ингибирования ее соответствующей концентрацией хлоргилина. Концентрация тирамина 2,0 мМ. По оси абсцисс — хлоргилин, М; по оси ординат — активность, %

лин является избирательным ингибитором МАО типа А [5]. Поэтому первую фазу кривой, отражающую действие низких концентраций хлоргилина, связывают с его избирательным действием на МАО типа А, действие высоких концентраций — на МАО типа Б [5, 8]. Более высокая оставшаяся активность после ингибирования МАО типа А в мозгу крыс «каталептиков» по сравнению с контрольными животными, как это можно видеть при сопоставлении высоты зон плато (рисунок), указывает на селективное увеличение активности МАО типа Б в полушариях мозга крыс «каталептиков».

Наряду с этим были выявлены изменения в кинетических характеристиках реакций дезаминирования бензиламина и дофамина у предрасположенных к каталепсии крыс (табл. 2). Было установлено, что генетически предрасположенные к каталепсии животные характеризуются повышенными значениями как V , так и K_m при дезаминировании бензиламина (табл. 2). Следовательно, изменение активности МАО типа Б в мозгу крыс «каталептиков» связано с увеличением максимальной скорости пре-

Таблица 1

Активность MAO мозга крыс, наследственно предрасположенных к развитию каталепсии (нмоль аммиака/мг белка/мин). Концентрация субстратов равнялась 2,0 мМ)

Группы животных	Стол мозга			Полушария		
	Серотонин	Бензиламин	Дофамин	Серотонин	Бензиламин	Дофамин
Предрасположенные к каталепсии крысы	2,35±0,19 (14)	2,30±0,08* (6)	3,02±0,08* (6)	1,71±0,10* (8)	1,90±0,07* (8)	2,41±0,04* (8)
Контроль	2,30±0,22 (14)	1,62±0,03 (8)	1,46±0,16 (8)	2,21±0,12 (8)	1,59±0,05 (8)	1,86±0,05 (8)

Примечание. Здесь и в табл. 2 * $p < 0,05$ по сравнению с контролем. В скобках указано число животных.

Таблица 2

Кинетические характеристики V (нмоль NH_3 /мг белка/мин) и K_m (мкМ) реакции дезаминирования бензиламина, дофамина, серотонина MAO мозга крыс, наследственно предрасположенных к каталепсии.

Группы животных	Стол мозга						Полушария					
	Серотонин		Бензиламин		Дофамин		Серотонин		Бензиламин		Дофамин	
	V	K_m	V	K_m	V	K_m	V	K_m	V	K_m	V	K_m
Предрасположенные к каталепсии крысы	4,80± 0,80	589,0± 145,0	2,86±* 0,26	313,0± 43,0	3,49±* 0,39	201,0± 45,0	3,07± 0,58	670,0± 170,0	2,64±* 0,16	448,0±* 42,0	3,76±* 0,73	376,0± 160,0
Контроль	3,67± 0,47	408,0± 83,0	1,42± 0,35	101,0± 28,0	2,02± 0,08	417,0± 271,0	3,89± 0,84	619,0± 188,0	1,65± 0,13	137,0± 25,0	1,34± 0,09	685,0± 240,0

ращения МАО-бензиламин комплекса при сниженном средстве МАО типа Б к бензиламину по сравнению с контрольными животными. Увеличение значений V как в стволе, так и в полушариях мозга крыс «каталептиков» было обнаружено и при дезаминировании дофамина, но при этом существенных изменений K_m отмечено не было. Кинетические характеристики реакции дезаминирования серотонина в полушариях и в стволе мозга крыс, предрасположенных к развитию катаlepsии, существенно не отличались от K_m и V реакции дезаминирования серотонина в мозгу контрольных животных.

Обсуждение результатов

У крыс, селекционированных на выраженную предрасположенность к возникновению катаlepsии, обнаружены значительные изменения в активности и кинетических свойствах МАО типа Б в стволе и в полушариях мозга и менее выраженное, но достоверное снижение активности дезаминирующей серотонин МАО в полушариях. Эти данные привлекают особое внимание к МАО Б. Нужно отметить, что повышение активности МАО типа Б было обнаружено в мозгу умерших больных шизофренией [10, 11, 21], хотя при этом возникает сомнение [11], не связано ли изменение в активности МАО Б с предшествующим лечением этих больных нейролептиками. Повышение активности МАО типа Б без изменения МАО типа А найдено при старении [22], при болезни Альцгеймера [8], при болезни Хантингтона [9] и при гемитрансекции мозга крыс, ведущей к дегенерации нейронов [8]. В основе этих процессов может лежать сходный механизм—пролиферация глии, поскольку имеющиеся данные свидетельствуют о том, что МАО типа Б локализована преимущественно в нейроглии.

Хотя в механизмах катаlepsии, по-видимому, принимает участие ряд регуляторов, основным в ее механизмах считают ослабление дофаминергических и усиление серотонинергических влияний [14]. Представленные данные свидетельствуют о том, что в ослаблении дофаминергических эффектов существенную роль может играть усиление окислительного дезаминирования дофамина, связанное с повышением активности МАО типа Б. В то же время в полушариях мозга крыс «каталептиков» были обнаружены противоположной направленности изменения в активности МАО типа А и в дезаминировании серотонина, являющегося специфическим субстратом для этой формы МАО, которые были менее выражены, чем изменения МАО типа Б, не сопровождались изменением кинетических характеристик реакции и обнаруживались только в полушариях, но не в стволе мозга. Можно предположить, что изменения МАО типа А более локальны. Во всяком случае, повышение активности триптофангидроксилазы было нами [15] обнаружено только в стриатуме, представляющем основной центральный регулятор мышечного тонуса, но не в среднем мозгу, гипоталамусе, гиппокампе.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о существенных изменениях МАО, особенно МАО типа Б, в мозгу крыс, генети-

чески предрасположенных к развитию катаlepsии, и дают основания полагать, что изменения активности MAO играют определенную роль в механизмах развития катаlepsии.

SOME CHARACTERISTICS OF BRAIN MONOAMINE OXIDASE IN RATS WITH GENETIC PREDISPOSITION TO CATALEPSY

N. K. POPOVA, N. N. VOITENKO, V. G. KOLPAKOV, and T. A. ALEKHINA

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

The activity of benzylamine- and dopamine-deaminating MAO in the brain stem and cerebral hemispheres (including corpus striatum) of rats predisposed to catalepsy was elevated, whereas the activity of serotonin-deaminating type A MAO was decreased in the hemispheres of these animals. Rats with predisposition to catalepsy differed from the controls in that the V_{max} of their benzylamine- and dopamine- deaminating MAO was higher in the brain stem as well as in hemispheres.

ЛИТЕРАТУРА

1. Youdim B. H., Ashkenazi R. In: *Advances in Biochemical Psychopharmacology* (ed. Ho B. T., Schooler J. C., Usdin E.), p. 35-61, Raven Press, New York, 1982.
2. Cooper J. R., Bloom F. E., Roth R. H. *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, Univ. Press, New York-London, 1974.
3. Горкин В. Э., Москвитина Т. А., Камышанская Н. С. Вестн. АМН, № 8, с. 55-59, 1984.
4. Cawton R. M., Breakefield X. O. *Biochem. Pharmacol.*, v. 32, № 3, p. 441-448, 1983.
5. Johnston J. P. *Biochem. Pharmacol.*, v. 17, p. 1285-1297, 1968.
6. Yang H. Y. T., Neff N. H. *J. Pharmacol. expt. Therap.*, v. 187, № 2, p. 365-371, 1973.
7. Garrick N., Murphy D. *Biochem. Pharmacol.*, v. 31, № 24, p. 4061-4066, 1982.
8. Orelund L., Fowler C., Carlsson A., Magnusson T. *Life Sci.*, v. 26, p. 139-146, 1980.
9. Mann J. J., Stanley M., Gershon S., Rossor M. *Science*, v. 210, p. 1369-1371, 1980.
10. Eckert B., Gottfrides C.-G., von Knorring L., Orelund L., Wiberg A., Winblad B. In: *Progress Neuropsychopharmacol.*, v. 4, p. 57-68, Pergamon Press, Gr. Britain, 1980.
11. Fowler C. J., Carlsson A., Winblad B. *J. Neural Transmission*, v. 52, p. 23-32, 1981.
12. Колпаков В. Г.—В кн.: *Очерки по генетике поведения*, с. 186-222, Наука, Новосибирск, 1978.
13. Kolpakov V., Barykina N., Chepkasov I. *Behavioural Processes*, v. 6, p. 269-281, 1981.
14. Pycock C. J., Hozton R. W., Carter C. J. In: *Dopamine. Adv. Biochem. Psychopharmacol.* (ed. Roberts P.), v. 19, Raven Press, N. Y. 1978.
15. Kolpakov V. G., Kulikov A. V., Barykina N. N., Alekhina T. A., Popova N. K. *Biochemic Amines*, v. 2, № 2, p. 131-136, 1985.

16. Барыкина Н. Н., Чепкасов И. Л., Алехина Т. А., Колпаков В. Г. Генетика, т. 19, № 112, с. 2014—2021, 1983.
17. Gray E. G., Whittaker V. P. J. Anat., v. 96, part 1, p. 79—87, 1962.
18. Горкин В. Э., Гринцова Л. И., Романова Л. А., Свєрзина И. С. Биохимия, т. 27, № 6, с. 1004—1014, 1962.
19. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной химии. М., Мир, 1979.
20. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вopr. мед. химии № 8, с. 538—545, 1962.
21. Schwartz M. A., Aikens A. M., Wyatt R. J. Psychopharmacologia, v. 38, p. 319—344, 1974.
22. Knoll J.—In: Strategy in Drug Research (ed. J. A. Keverling Buismann), p. 107—135, Elsevier, Amsterdam, 1982.
23. Schoep D. D., Azzaro A. J. J. Neurochem. v. 40, № 5, p. 1340—1348, 1983.

Поступила 24. I 1988

Рецепторы (под ред. Р. М. Conn), Academic Press, Лондон, Англия, т. 1—4. (1984—1986 гг.).

The Receptors (ed. P. M. Conn), Academic Press, London, England, v. I—IV.

Книги содержат аналитические обзоры работ, посвященных исследованию рецепторов по широкому спектру дисциплин—фармакологии, эндокринологии, биохимии, клеточной биологии и нейронаукам. Главной целью этих исследований является идентификация сходств и различий между рецепторами и мембранными рецепторами системами. Междисциплинарный подход позволяет ознакомить ученых и исследователей с проблематикой, находящимися вне сферы их непосредственной деятельности. Авторы статей каждого тома суммируют сведения по известным рецепторным системам, пересматривают ранние данные по рецепторам в свете новых открытий и обсуждают методы и достижения, представляющие потенциальный интерес для дальнейшего изучения рецепторов.

УДК 547.964.4:591.481.1:57.083.3

РАДИОИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КАРДИОАКТИВНОГО БЕЛОК-ГОРМОНАЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ГИПОТАЛАМУСА

СРАПИОНЯН Р. М., АБЕЛЯН Ж. Г., РОСТОМЯН М. А.,
ГАБРИЕЛЯН С. К., БОЧКО И. Ф.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Получена кроличья антисыворотка к кардиоактивному белок-гормональному комплексу (БГК), выделенному из бычьего гипоталамуса. Установлена методом иммуноэлектрофореза высокая специфичность указанной антисыворотки (процент перекрестных реакций с двумя другими кардиоактивными комплексами не превышает 0,1%).

Разработан метод радиоиммунологического анализа содержания БГК в экстрактах органов кошки, позволяющий обнаружить до 0,05 нг БГК в пробе. Используя реакцию связывания комплемента удалось установить специфичность кардиоактивного БНК для нервной ткани, в которой его содержание в 10^3 раз выше по сравнению с другими тканями. Содержание БНК-подобного иммунореактивного материала в висцеральных органах, за исключением печени, невелико (0,07—0,13 нг/г свежей ткани) и распределено относительно равномерно. На основании полученных данных допускается возможность как синтеза БГК-подобного соединения в различных органах, так и выброса гипоталамического БНК в общую циркуляцию.

Ранее нами из гипоталамусов крупного рогатого скота были изолированы и идентифицированы 4 кардиоактивных белок-гормональных комплекса [1]. Была установлена гликопротеиновая природа диссоциированных из комплекса высокомолекулярных компонентов и доказана гомологичность низкомолекулярных кардиоактивных соединений с ранее выделенными нейрогормонами «К», «С» и «Г» [12].

Был выяснен нековалентный, по-видимому, электростатический характер связывания гликопротеинов с кардиоактивными нейрогормонами и образование соответствующих белок-гормональных комплексов, условно обозначенных нами БНК, БНС и БНГ [3]. Изучение субклеточной локализации искомых белок-гормональных комплексов (БГК) установило их преимущественное содержание (примерно 70%) в синапсомной фракции и нейросекреторных гранулах (около 30%). В остальных исследуемых субфракциях—миелиновой, митохондриальной и ядерной—подобная коронарность не была обнаружена.

Учитывая, что с представлениями о специфичности, распределении и дифференциации этих БГК связано решение ряда вопросов, среди кото-

рых значительными являются иммунохимические подходы, особое внимание было уделено получению специфических к ним антисывороток. Выработанные кроличьи антисыворотки были высокоспецифичными [4]: процент перекрестных реакций между комплексами не превышал 0,1%. Выявляемая при этом единственная дуга преципитации свидетельствовала также об иммунохимической гомогенности используемых антигенов. Помимо сказанного, антисыворотки характеризовались достаточной чувствительностью и, как оказалось впоследствии в радиоиммунологических опытах по исследованию количественного содержания БНК-подобной иммунореактивности (ИР), позволяли определить до 50 пг в пробе [5]. В сравнительном аспекте было проведено также радиоиммунологическое исследование распределения и количественного содержания подобной иммунореактивности в мозгу и некоторых органах крысы, кошки и быка [6].

Целью настоящего исследования явилось радиоиммунологическое изучение содержания БНК-подобного материала в отделах головного мозга, а также различных органах кошки.

Материалы и методы

Электрофоретически гомогенный БНК был выделен и очищен из гипоталамусов крупного рогатого скота по схеме, описанной ранее [3]. Получение антисыворотки к БНК. Антисыворотку к БНК получали методом его многократной инъекции кроликам по следующей схеме. Первую инъекцию проводили подкожно в нескольких точках. Животные получали антиген в виде коллоидной смеси с адьювантом Фрейнда. Через 2 недели осуществляли второй цикл иммунизации—одноразовое введение антигена. Третий цикл (через 4 недели) включал в себя подкожное введение вещества в четырех точках и одну внутримышечную инъекцию. Спустя 1 месяц проводили четвертый цикл иммунизации—одноразовое введение антигена в одной точке. Реиммунизация была сделана в виде повторного одноразового внутривенного введения животному 1 мг БНК без адьюванта. Каждое животное в итоге получало 2 мг БНК. Кровь брали из ушной вены на 4, 7, 9, 14 и 20 дни иммунизации и через 7—10 дней после реиммунизации. Сыворотку крови лиофилизировали и хранили при -14° . Использовали ее без дальнейшей очистки. Специфичность антисыворотки проверяли методом двойной иммунодиффузии по Ouchterlony [7]. Аналитический иммуноэлектрофорез проводили по методу Грабара, Буртина [8].

Иодирование проводили с помощью хлорамина Т по методу Greenwood и соавт. [9] с некоторыми модификациями. Реакционная смесь содержала: 5 мкг БНК, растворенного в 10 мкл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,5; 1 μ Ки [125 I] («Amersham», Англия), 50 мкг хлорамина Т, растворенного в 10 мкл того же буфера, через 40 с добавляли 120 мкг м-бисульфита натрия в 10 мкл 0,05 М фосфатного буфера, pH 7,6 и 50 мкг йодистого калия в 20 мкл того же буфера. Иодированный продукт отделяли на колонке размерами 1×120 см с сефадексом G-25 и элюировали 0,005 М фосфатным буфером, содержащим 1%-ный БСА, со скоростью 0,5 мл/мин. Фракции, содержащие иодированный БНК, разводили веро-

наловым буфером № 1, рН 8,1 с составом (г/л): Na-бисульфит—10,3, NaCl—5, азид натрия—0,1, БСА—5, разливали по 0,2 мл и хранили при —20°. Эксперименты велись в пластиковых пробирках. В ходе опытов были применены процедуры, модифицированные Bolton, Hunter [10]. К 100 мкл немеченого антигена добавляли 100 мкл кроличьей антисыворотки к БНК в конечном разведении 1:10000 в буфере № 1. После инкубации при 4° в течение 24 ч добавляли 200 мкл йодированного белка, с меткой составляющей приблизительно 10000 имп., тщательно смешивая содержимое, и инкубировали 24 ч при 4°. Затем добавляли 150 мкл неиммунной кроличьей сыворотки, 100 мкл вторичных козьих антител и после 1 ч инкубации при 4° центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин. Радиоактивность препаратов БНК измеряли на сцинтилляционном счетчике SL-4221 («Intertechnique», Франция), рассчитывая величину, характеризующую связь между радиоактивностью и количеством связанного БНК.

Выделение и экстракция тканей. Кусочки различных органов кошки были взяты после тщательной перфузии. С этой целью у животного под уретановым наркозом вскрывали грудную клетку, вставляли канюлю в левый желудочек сердца. При помощи специальной системы под давлением вводили физиологический раствор (около 4,5 л) до тех пор, пока из надреза в области правого ушка предсердия не вытекала прозрачная жидкость. После декапитации животного были взяты различные отделы головного мозга, сердечная, почечная, селезеночная, легочная, печеночная ткани, а также поджелудочная железа, надпочечники и скелетная мышца. Ткани тщательно гомогенизировали водой в соотношении 1:2 (масса/объем) в механическом гомогенизаторе Уорринга и гомогенат центрифугировали 20 мин при 5000 об/мин. Из надосадочной жидкости осаждали белки сульфатом аммония в пределах 70—100% насыщения. Полученный осадок растворяли в веронал-мединаловом буфере, рН 8,6 и диализовали против воды в течение 48 ч. Лиофилизированные порошки тканевых экстрактов и сыворотки крови использовали для определения в них иммунной активности.

Иммуноцитохимическое исследование БНК осуществляли пероксидазно-антипероксидазным методом по общепринятой схеме с некоторыми модификациями [11]. Крыс фиксировали внутриаортальной перфузией смесью Замбони. После перфузии извлеченный мозг дополнительно фиксировали в течение ночи в смеси такого же состава. Срезы, приготовленные на вибротоме и многократно промытые в растворе солевого фосфатного буфера, неоднократно замораживали и оттаивали с целью некоторого повреждения мембран и для лучшего проникновения антител и других компонентов среды. Далее материал инкубировали со специфической антисывороткой БНК, разведенной 1:50. После реакции срезы постфиксировали 10 мин в 1%-ной забуференной четырехокиси осмия, обезвоживали и заливали в араалдит в виде плоско-параллельной заливки. Для блокирования неспецифического окрашивания срезы инкубировали 60 мин в 10%-ной козьей сыворотке. Эндogenous пероксидазы инактивировали инкубацией в 0,3%-ном растворе H_2O_2 в течение 15 мин.

Результаты и обсуждение

Результаты проведенных исследований показали, что активными оказались иммунные сыворотки, взятые на 7-й и последующие дни иммунизации. Однако максимальный титр антисыворотки к БНК был достигнут через семь дней после реиммунизации. Антигенная гомогенность БНК была показана иммуноэлектрофоретически: полученная единственная дуга преципитации в случае использования в качестве антигена экстракта гипоталамической ткани свидетельствовала о моноспецифичности БНК-сыворотки. Уместно отметить, что почти полных экстрактов тканей различных органов (печени, сердца, почек, поджелудочной железы, селезенки, взятых в качестве антигена, реакция преципитации не была получена. Были поставлены также перекрестные реакции антисыворотки БНК с антигенами белок-носителей БНС и БНГ. Отсутствие дуг преципитации позволяло предположить строгую специфичность каждого белок-гормонального комплекса в отдельности.

Гель-фильтрация йодированного продукта БНК на сефадексе G-25 выявила наличие двух пиков: в первом из них содержался $[^{125}\text{I}]$ БНК, на долю которого приходится 35% общей радиоактивности, а второй пик состоял из свободного йода, выходящего через строго определенный промежуток времени (12 мин.).

На рис. 1 приведена стандартная кривая для радиоиммунологического определения содержания бычьего БНК в мозгу и различных органах.

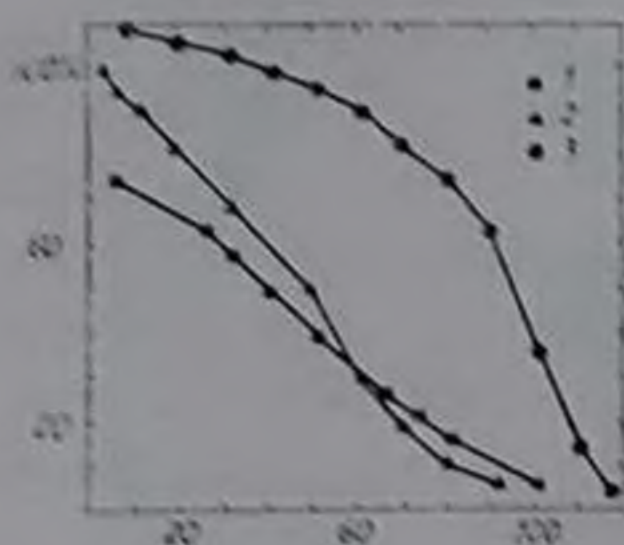


Рис. 1. Стандартная кривая для радиоиммунологического определения количественного содержания бычьего БНК (3). По оси абсцисс—содержание немеченого БНК и по оси ординат—процент связывания $[^{125}\text{I}]$ БНК с антисывороткой к бычьему антигену

Чувствительность метода в его обычном варианте позволяет достоверно измерить до 50 пг БНК-подобной ИР. Данные по распределению БНК суммированы в табл. 1 и 2. Как видно, БНК почти не обнаруживает достоверных различий в содержании в большинстве исследуемых регионов

Таблица 1

Распределение иммунореактивного белок-гормонального комплекса в мозгу

Анатомические части	Содержание БНК (мкг/г свежей ткани)
Кора больших полушарий	0,63 ± 0,07
фронтальная	0,90 ± 0,28
затылочная	0,75 ± 0,47
Таламус	1,00 ± 0,10
Гипоталамус	0,90 ± 0,17
Мозжечок	0,80 ± 0,60
Продолговатый мозг	0,77 ± 0,45
Нейрогипофиз	

мозга. Можно утверждать, что столь равномерное распределение БНК не объясняется присутствием крови, так как, во-первых, у перфузированных животных выявляется аналогичная картина, во-вторых, при пересчете на мг белка содержание БНК в сыворотке крови существенно ниже, чем определяемое в мозгу. Эти данные, свидетельствующие о преобладающем содержании БНК в мозгу (в 10^3 раз превышающее таковое в любом другом органе), однозначно утверждают о его специфичности для нервной

Таблица 2

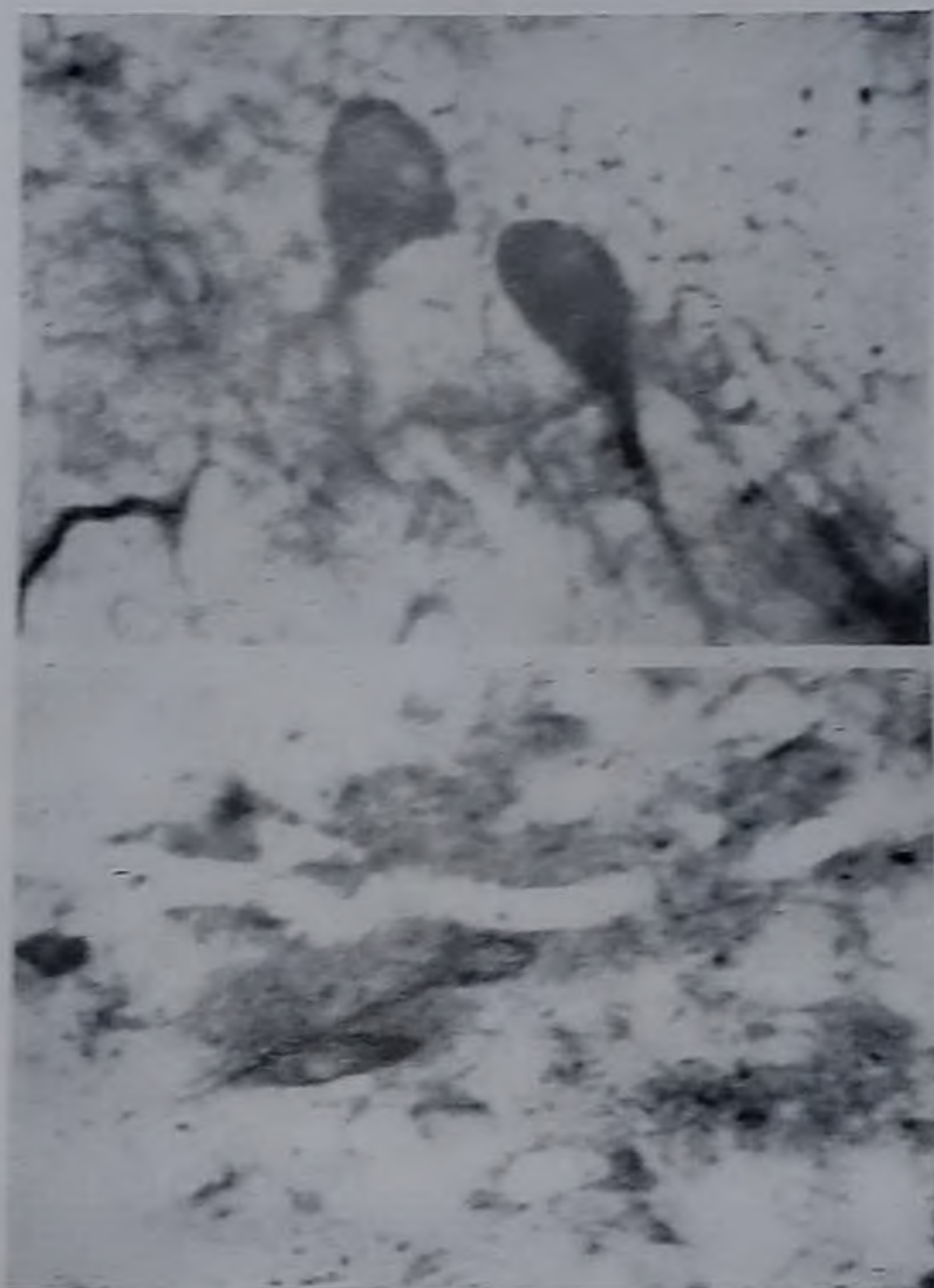
Уровень иммуореактивного белок-гормонального комплекса
в различных тканях

Ткани	Содержание БНК (нг/г свежей ткани)
Сердце	$0,10 \pm 0,23$
Печень	$0,80 \pm 0,48$
Легкие	$0,13 \pm 0,05$
Селезенка	$0,07 \pm 0,02$
Скелетная мышца	$0,13 \pm 0,03$
Почка	$0,07 \pm 0,01$
Панкреатическая железа	0
Надпочечники	0

ткани. Высокое содержание БНК в гипоталамусе и мозжечке было показано и при иммуоцитохимическом исследовании его распределения в мозгу. Из ядер гипоталамуса наиболее четкое выявление реакции наблюдается в супрахиазматическом ядре, в составе которого всегда встречаются небольшие группы нервных клеток, проявляющих положительную реакцию на антитела к БНК. Четко окрашиваются цитоплазма и нервные отростки (рис. 2). Отдельные темные гранулы на рисунке, возможно, указывают на наличие реакции в синаптических окончаниях. Обнаружение же изучаемого комплекса в нервных отростках может свидетельствовать о возможности его миграции вдоль нервного волокна и последующей секреции в кровеносное русло. В клетках Пуркинье также наблюдалась интенсивная реакция на исследуемый белок, в остальных областях мозжечка реакция отсутствовала (рис. 3). Кажущиеся разногласия с результатами биологического тестирования, очевидно, можно объяснить тем, что по сравнению с общим объемом мозжечка монослой, занимаемый клетками Пуркинье, невелик, а вся активность, определяемая в мозжечке, представляет собой средние значения, относящиеся ко всей ткани в целом, а не к конкретным популяциям, в которых она сосредоточена.

Сопоставление концентраций БНК-подобной ИР в висцеральных органах показало, что, за исключением печени (табл. 2), его содержание в остальных тканях невелико и распределено относительно равномерно. Значительное содержание БНК-подобного материала обнаружено в крови — 13 нг/мл. Эти данные, по-видимому, могут свидетельствовать о выбросе гипоталамического БНК в общую циркуляцию при условиях, провоцирующих выход кардиоактивного нейrogормона «К». В пользу этого допущения убеждают полученные ранее данные об увеличении содержания другого кардиоактивного белок-гормонального комплекса — БНГ после

Рис. 2. Окрашивание по Романовскому-Гимазу. Показано наличие эритроцитов (эритроциты) и лейкоцитов (лейкоциты) в крови. (Масштаб 100 мкм)





УДК 577.23+577.153

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ H^+ -АТРАзы МИТОХОНДРИЙ МОЗГА

ХВАТОВА Е. М., КОРЯГИН А. С.

Горьковский государственный медицинский институт им. С. М. Кирова

Исследованы каталитические свойства растворимой АТРаза митохондрий мозга. Скорость нуклеозидтрифосфатазной реакции представлена рядом: $ATP > ITP > GTP > UTP > CTP$, высокую каталитическую активность F_1 -АТРаза проявляет в присутствии ионов двухвалентных металлов.

Сравнительное изучение кинетических свойств растворимого и мембраносвязанного фермента в составе СМЧ, проведенное методами стационарной кинетики, показало, что скорость гидролиза Mg -АТР растворимой АТРазой подчиняется кинетике Михаэлиса-Ментен, а для мембраносвязанного фермента характерна нелинейная зависимость скорости гидролиза субстрата.

АТРазный комплекс, полученный методом обработки СМЧ мозга дезоксиколатом, обладает низкой каталитической активностью. Реконструкция комплекса с фосфолипидами увеличивает его АТРазную активность. Максимальную активирующую способность имеет фосфатидилсерин, наименьшую — фосфатидилэтаноламин.

Синтез АТР в процессе окислительного фосфорилирования осуществляется митохондриальной протонной аденозинтрифосфатазой (КФ 3.6.1.3). H^+ -АТРазный комплекс находится во внутренней мембране митохондрий и состоит из каталитической части — растворимой АТРазы (F_1 -АТРаза) и мембранных компонентов (комплекс F_0).

При гидролизе АТР митохондриальной АТРазой не образуется ковалентносвязанных интермедиатов [1]. В связи с этим исследование кинетики остается одним из основных методологических подходов к изучению механизма функционирования АТРазного комплекса [2].

Большинство работ по изучению кинетики и регуляторных свойств этого фермента выполнены на препаратах из сердца и печени. Исследования H^+ -АТРазного комплекса митохондрий головного мозга не проводились, хотя эти сведения для нервной ткани имеют особое значение.

Функционирование мембранных белков в значительной степени определяется их взаимодействием с липидным бислоем. H^+ -АТРазный комплекс, лишенный фосфолипидного окружения, не обладает каталитической

активностью. Реконструкция фермента с липидами возвращает ему утраченные свойства [3].

Растворимая АТРаза при отделении её от мембраны теряет ряд свойств, присущих ей в составе митохондрий. Так, известно об изменении чувствительности фермента к низкой температуре и различным ингибиторам [4, 5], что получило название «аллотопии» [6]. Изменение свойств фермента при его отделении от мембраны связывают с действием, которое оказывают на F_1 -АТразу белки комплекса F_0 , а также липиды мембраны.

Целью настоящего исследования явилось изучение каталитических и регуляторных свойств H^+ -АТРазного комплекса митохондрий мозга в форме растворимого (F_1 -АТРаза) и мембраносвязанного фермента, а также значений белок-липидных взаимодействий. С целью оценки каталитических свойств растворимой H^+ -АТРазы мозга исследовали субстратную специфичность в нуклеозидтрифосфатазной реакции, участие ионов двухвалентных металлов в проявлении ферментативной активности. Проводили сравнительное изучение кинетических свойств растворимой и мембраносвязанной форм АТРазы в составе СМЧ, а также исследование влияния различных фосфолипидов на активность АТРазного комплекса.

Материалы и методы

Очищенный препарат растворимой H^+ -АТРазы получали из митохондриальной фракции головного мозга крупного рогатого скота по разработанной нами методике [7]. СМЧ получали ультразвуковой обработкой митохондрий [8]. $33P$ частицы, представляющие белковые фрагменты мембран митохондрий, получали по методу Kagawa, Racker [9], в качестве детергента использовали 0,5%-ный $DOX-Na$.

Субстратную специфичность растворимой АТРазы в нуклеозидтрифосфатазной реакции определяли, используя в качестве субстратов АТР, ИТР, ГТР, УТР, СТР. Инкубационная среда содержала 2 мМ нуклеозидтрифосфата, 2 мМ $MgSO_4$, 3 мМ трис- HCl , pH 8,3 [10]. Зависимость АТРазной активности фермента от содержания в среде ионов двухвалентных металлов исследовали, заменяя в инкубационной среде Mg^{2+} на Ca^{2+} , Mn^{2+} в такой же концентрации. АТРазную активность регистрировали рН-метрическим методом [11]. В пробу конечным объемом 7 мл вносили 15—20 мкг белка очищенного фермента, реакцию регистрировали в течение 1—2 мин. Величину У. А. выражали в мкмоль P_i /мин/мг белка.

Исследование зависимости скорости ферментативной реакции растворимого и мембраносвязанного фермента от концентрации проводили методами стационарной кинетики. Значения величин K_m и V определяли в координатах Эди-Хофсти. Скорость реакции выражали в мкмоль P_i /мин.

Изучение влияния фосфолипидов на АТРазную активность проводили методом реконструкции H^+ -АТРазного комплекса с липосомами. В работе использованы хроматографически чистые фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, а также общая фракция липидов митохондрий мозга. Ферментативную активность реконструированных протелипосом определяли рН-метрическим методом с использованием обычной среды инкубации.

Общее содержание фосфолипидов в препаратах выражали в мкмоль P_i /мг белка. P_i определяли по методу Gerlach, Deulich [12]. Общую фракцию липидов получали экстракцией смесью хлороформ-метанол из митохондрий мозга крупного рогатого скота [13]. Концентрацию белка определяли по методу Lowry и соавт. [14].

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования с использованием в качестве субстрата ферментативной реакции пуриновых и пиримидиновых нуклеозидтрифосфатов свидетельствуют, что скорость нуклеозидтрифосфатазной реакции для H^+ -АТразы мозга убывает в ряду: $АТР > ИТР > ГТР > УТР > СТР$ (табл. 1). Как видно, ИТР, ГТР, УТР, СТР могут служить в качестве субстрата для F_1 -АТразы. Однако скорость гидролиза этих нуклеозидтрифосфатов ниже скорости гидролиза АТР. Так, гидролиз ИТР происхо-

Таблица 1

Нуклеозидтрифосфатазная активность F_1 -АТразы мозга

Субстрат реакции	Активность, мкмоль P_i /мин на мг	% от скорости гидролиза АТР
АТР	$18,06 \pm 0,54$ (5)	100
ИТР	$9,79 \pm 0,97$ (3)	54,21
ГТР	$5,44 \pm 0,13$ (5)	30,12
УТР	$3,01 \pm 0,38$ (3)	16,66
СТР	$1,32 \pm 0,11$ (5)	7,31

Примечание. В скобках указано количество опытов.

дит с меньшей скоростью, в 1,7 раза, а ГТР в 3 раза, чем гидролиз АТР. Значительно медленнее АТРаза гидролизует пиримидиновые нуклеозидтрифосфаты.

Полученные результаты указывают, что растворимая АТРаза мозга не проявляет абсолютной специфичности в отношении нуклеозидтрифосфатов. Кроме АТР, другие нуклеозидтрифосфаты могут служить субстратом для F_1 -АТразы, однако гидролиз пиримидиновых нуклеозидтрифосфатов идет со значительно меньшей скоростью по сравнению с пуриновыми нуклеозидтрифосфатами. В этом свойстве АТразы мозга не имеет отличий от фермента из других тканей [10, 15].

Для протекания АТРазной реакции, катализируемой F_1 -АТразой мозга, требуется наличие в среде ионов двухвалентных металлов. Гидролиз АТР при отсутствии в среде ионов двухвалентных металлов возможен, однако введение Mg^{2+} вызывало увеличение скорости реакции примерно в 6 раз. Добавка в среду Mn^{2+} увеличивала скорость гидролиза АТР в 3,5 раза, введение Ca^{2+} практически не увеличивало скорость АТРазной реакции (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что максимальную АТРАЗную активность фермент из мозга проявляет в присутствии Mg^{2+} , ионы других двухвалентных металлов— Mn^{2+} , Ca^{2+} менее эффективны.

Таблица 2

Активность F_1 -АТРаза мозга при наличии в среде ионов двухвалентных металлов

Ионы	Активность, μ моль P_i /мин на мг	% от скорости гидролиза Mg -АТР
—	$3,02 \pm 0,26$ (3)	15,89
Mg^{2+}	$19,00 \pm 0,95$ (5)	100,00
Mn^{2+}	$10,45 \pm 0,31$ (5)	55,00
Ca^{2+}	$3,58 \pm 0,59$ (5)	18,84

Примечание. Концентрация АТР в среде 2 мМ.

Изучены кинетические свойства растворимой АТРаза митохондрий мозга. На рис. 1, а представлен график зависимости V_0 от концентрации Mg -АТР. Эта зависимость имеет гиперболический характер, что свидетельствует о подчинении кинетики гидролиза Mg -АТР растворимой АТРазой мозга уравнению Михаэлиса-Ментен.

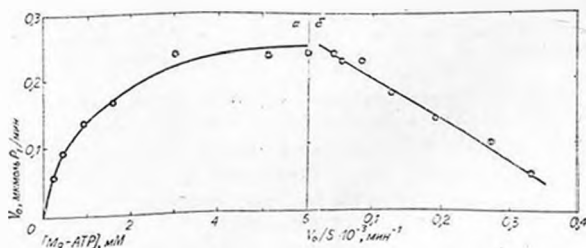


Рис. 1. Зависимость начальной скорости АТРАЗной реакции, катализируемой растворимой АТРазой, от концентрации Mg -АТР: а—в координатах V_0 от S , б—в координатах Эди-Хофсти (V_0 от V_0/S)

В координатах Эди-Хофсти эта зависимость линейна (рис. 1, б). Величина K_m , определенная для Mg -АТР в этих координатах, равна 0,69 мМ, максимальная скорость реакции составила 0,28 μ моль P_i за мин. Величины K_m и V для АТРаза мозга сопоставимы с данными, приведенными для фермента из других тканей [16].

Изучены кинетические свойства мембраносвязанной H -АТРаза в составе СМЧ мозга. На рис. 2, а показан график зависимости V_0 от нарастающих концентраций Mg -АТР. График зависимости V_0 от S в этом случае также имеет форму, близкую к гиперболе, однако в пределах изученных концентраций насыщения фермента субстратом не достигается (рис. 2, а).

В координатах Эди-Хофсти эта зависимость имеет нелинейный характер. Прямая имеет точку перегиба при V_0 —1,5 мкмоль P_i /мин и V_0/S — $0,78 \cdot 10^{-3}$ (рис. 2, б). В табл. 3 представлены соответствующие значения K_m и V . Исходя из нелинейной зависимости V_0 от S в координатах Эди-Хофсти, каждая величина имеет два значения. Нелинейная зависимость скорости гидролиза АТР ферментом ранее была описана для СМЧ сердца [17] и печени [18].

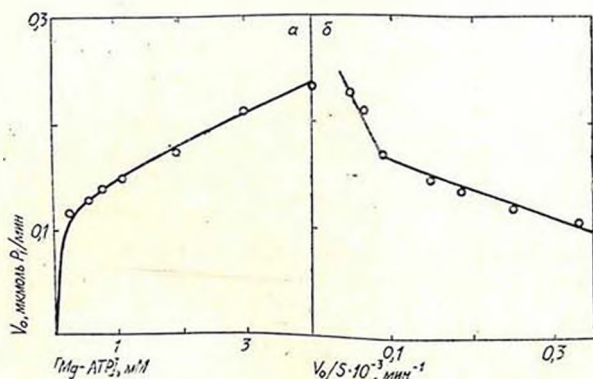


Рис. 2. Зависимость начальной скорости АТРазной реакции, катализируемой H^+ -АТРазой мозга и составе СМЧ, от концентрации Mg-АТР: а—в координатах V_0 от S , б—в координатах Эди-Хофсти (V_0 от V_0/S)

Полученные результаты свидетельствуют о проявлении ферментом аллостерических свойств и неподчинении кинетике Михаэлиса-Ментен скорости гидролиза Mg-АТР мембраносвязанной АТРазой. Проявление ферментом аллостерических свойств связывают с действием природного белкового ингибитора АТРазы, так как в его отсутствие зависимость скорости гидролиза АТР носит линейный характер [17, 18].

Таблица 3
Значения кинетических характеристик мембраносвязанной АТРазы

K_{m1} , мМ	K_{m2} , мМ	V_1 , мкмоль P_i /мин	V_2 , мкмоль P_i /мин
0.16	1.97	0.163	0.315

При утрате связи с мембраной фермент теряет ряд регуляторных свойств. Это можно связать с потерей ферментом связи с белковым ингибитором, а также нарушением белок-липидных взаимодействий, присущих ему в составе мембраны.

Для выяснения роли белок-липидных взаимодействий в регуляции H^+ -АТРазного комплекса нами проведены исследования по влиянию раз-

личных фосфолипидов на АТРазную активность фермента. Обнаружено, что АТРазная активность комплекса зависит от содержания фосфолипидов в мембране. 33 Р частицы, которые содержат в 6 раз меньшее количество фосфолипидов, по сравнению с СМЧ, обладали низкой У.А. (табл. 4). Реконструкция 33 Р частиц с фосфолипидами увеличивала их ферментативную активность. Инкубация частиц с фосфатидилхолином и фосфатидилэтаноламином приводила к увеличению АТРазной активности практически в 4 и 2 раза соответственно. Но в обоих случаях АТРазная активность реконструированных частиц была гораздо ниже исходной активности СМЧ. 33 Р частицы, реконструированные с фосфатидилсеринном имели наивысшую АТРазную активность, которая превышала исходную активность СМЧ примерно в 5 раз.

Проведена реконструкция 33 Р частиц с общей фракцией митохондриальных липидов мозга. АТРазная активность частиц, инкубированных со сложной смесью липидов мембраны митохондрий, была очень близка к таковой субмитохондриальных частиц (табл. 4).

Таблица 4

АТРазная активность СМЧ, 33 Р частиц и 33 Р частиц, реконструированных с фосфатидилхолином, фосфатидилэтаноламином, фосфатидилсеринном и общей фракцией митохондриальных липидов

Частицы	Активность, мкмоль Р _i /мин на мг белка
СМЧ	0,157±0,009 (5)
33 Р	0,0232±0,000 (5)
33 Р+ФЭА	0,0485±0,0045 (5)
33 Р+ФХ	0,0889±0,0038 (5)
СМЧ	0,118±0,006 (5)
33 Р+ФС	0,550±0,034 (5)
СМЧ	0,1705±0,0021 (5)
33 Р+ОФА	0,0838±0,0031 (5)

Примечание: ФЭА—фосфатидилэтаноламин; ФХ—фосфатидилхолин; ФС—фосфатидилсерин; ОФА—общая фракция митохондриальных липидов.

Полученные результаты показывают, что отрицательно заряженный фосфатидилсерин эффективнее всего активировал АТРазу.

Среди липидов мембран митохондрий мозга количественно преобладают фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин. Присутствуя примерно в одинаковых концентрациях, они в сумме составляют свыше 70% всего фосфолипидного состава митохондрий мозга, на третьем месте среди семи основных фосфолипидов мозга стоит фосфатидилсерин (11%) [19].

Анализ липидного состава мембран митохондрий печени, сердца и

мозга [19—21] показывает близость количественного содержания в них электронейтральных фосфолипидов: фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина. Основные различия установлены на уровне заряженных фосфолипидов: фосфатидилсерина, кардиолипина и фосфатидилинозита. Так, митохондрии мозга, по сравнению с митохондриями сердца и печени содержат в несколько раз больше фосфатидилсерина, и, в свою очередь, примерно в 2 раза меньше кардиолипина и фосфатидилинозита.

Проведенные исследования по реактивации АТРазного комплекса мозга фосфолипидами, а также анализ литературных данных липидного состава мембран митохондрий различных тканей свидетельствуют в пользу того, что активность АТРазного комплекса мозга во многом определяется отрицательно заряженными фосфолипидами, в частности: фосфатидилсеринном.

В мембранах эукариот наиболее устойчивые электронейтральные фосфолипиды (фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, сфингомиелин), составляя около 80% общего количества фосфолипидов, обуславливали устойчивость мембранных структур при нормальном физиологическом состоянии организма [22]. Поэтому можно полагать, что электронейтральные фосфолипиды митохондрий мозга обеспечивают устойчивое жидкокристаллическое состояние мембраны, а заряженные фосфолипиды поддерживают высокую каталитическую активность АТРазного комплекса.

Проведенные исследования H^+ -АТРазы митохондрий мозга показали, что ряд регуляторных свойств фермента опосредуется на уровне мембраны. Мембраносвязанный АТРазный комплекс, в отличие от растворимой АТРазы, характеризуется нелинейной зависимостью скорости гидролиза АТР, что свидетельствует о проявлении им аллостерических свойств. Активность комплекса во многом определяется отрицательно заряженными фосфолипидами мембраны, и в частности фосфатидилсеринном.

CATALYTICAL AND REGULATORY PROPERTIES OF BRAIN MITOCHONDRIAL H^+ -ATPase

E. M. KHVATOVA and A. S. KORYAGIN

Department of Biochemistry, Medical Institute, Gorky

The catalytic properties of soluble brain mitochondrial ATPase have been investigated. The nucleosidetriphosphatase reaction rate is increased in the following sequence: CTP < UTP < GTP < ITP < ATP. The activity of F_1 -ATPase requires the presence of divalent metal ions. The kinetic properties of the soluble and membrane-bound enzyme present in submitochondrial particles (SMP) were compared by the steady-state kinetic technique. Hydrolysis of Mg-ATP by the soluble ATPase obeys Michaelis-Menten kinetics, but membrane-bound enzyme has a non-linear Eadie-Hofstee plot. The ATPase complex obtained from brain SMP by desoxycholate treatment has low ATPase activity. The highest activating effect was found for phosphatidylserine, whereas phosphatidylethanolamine has the lowest effect.

ЛИТЕРАТУРА

1. Webb M. R., Grubmeyer G., Penefsky H. S., Trentham D. R. J. Biol. Chem., v. 255, p. 11637—11639, 1980.
2. Виноградов А. Д. Биохимия, т. 49, с. 1220—1238, 1984.
3. Микельсаар Х., Северина Н. И., Скулачев В. П. Успехи соврем. биол., т. 78, с. 348—370, 1974.
4. Миронов Г. П.—В кн.: Биофизика сложных систем и радиационных нарушений, с. 237—244, М., Наука, 1977.
5. Рэжер Э. Биоэнергетические механизмы, М., Мир, 1979.
6. Финсан Д., Колмен Р., Митчелл Р. Мембраны и их функции в клетке, М., Мир, 1977.
7. Хаатона Е. М., Новикова Н. А., Корягин А. С. Нейрохимия, т. 4, с. 30—34, 1985.
8. Racker E. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 43, p. 1659—1661, 1962.
9. Kagawa Y., Racker E.—J. Biol. Chem., v. 246, p. 5477—5487, 1971.
10. Коллов Н. А., Метельская В. А., Михайлов С. Н., Новикова Н. Ю., Флорентьева В. А. Биохимия, т. 43, с. 702—707, 1978.
11. Болдырев А. А., Лебедев А. В., Ритов Б. В. Вопр. мед. химии, т. 15, с. 622—626, 1969.
12. Gerlach E., Deutlich B. Biochem. Zeitschrift., T. 377, S. 477—479, 1963.
13. Кёйрс М. Техника липидологии, М., Мир, 1975.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
15. Fernandez-Belda F. G., Garcia-Carmona F., Garcia-Canovas F., Lozano J. A., Gomez-Fernandez J. G. Arch. Biochem. and Biophys., v. 215, p. 40—46, 1982.
16. Senior A. E.—In: Membrane proteins energy transduction (ed. R. R. Capaldi), p. 233—278, New York—Basel, 1979.
17. Klein G., Vignais P. V. J. Bioenerg. and Biomembr., v. 15, p. 347—362, 1983.
18. Citron N. M., Hultihen J., Schwerzman K., Pedersen P. L. Biochemistry, v. 21, p. 1878—1885, 1982.
19. Креч Е. М. Липиды клеточных мембран, Л., Наука, 1981.
20. Compe J., Maisterrena B., Gauteron D. C. Biochim. Biophys. acta., v. 419 p. 271—281, 1976.
21. Zambrano F., Fleischer S., Fleischer B. Biochim. Biophys. acta, v. 380, p. 357—369, 1975.
22. Наков В. Г., Берестовский Г. Н. Липидный бислой биологических мембран, М., Наука, 1982.

Поступила 14. XII 1987



УДК 577.153.661.717

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ МОЗГА КАПУСТНОЙ
МУХИ *DELIA BRASSICAE* С КАТИОННЫМИ ЛИГАНДАМИ

КРАСНОВА Т. И., ГРИГОРЬЕВА Г. М., ХОВАНСКИХ А. Е., *ЛЕЖНЕВА И. П.

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова АН СССР
*ВНИИ защиты растений ВАСХНИЛ, Ленинград

Изучали взаимодействие холинэстеразы (ХЭ) мозга весенней капустной мухи *Delia brassicae*, АХЭ (ацетилхолинацетилгидролаза, КФ 3.1.1.7) из эритроцитов крови быка и бутирилхолинэстеразы (ацилхолин-ацилгидролаза, КФ 3.1.1.8, БуХЭ) из сыворотки крови лошади с ионами тетраалкиламмония (ТАА), имеющими различную длину алкильного радикала, и производными пиридиния—N-метилпиридиния и 1,2,4-триметилпиридиния. Действие этих ионов оценивали величинами ингибиторных констант (K_i). Все использованные лиганды были обратимыми ингибиторами исследованных ХЭ по механизму действия, главным образом смешанного типа, и в отдельных случаях чисто конкурентного типа. Сравнительный анализ величин K_i для разных ХЭ показал, что ХЭ мух и АХЭ близки по силе действия к ним ионов ТАА, а по механизму взаимодействия с этими ионами ХЭ мух более сходна с БуХЭ. Для производных пиридиния по механизму действия также наблюдается большее сходство между ХЭ мух и БуХЭ. Для ХЭ мух установлено наибольшее возрастание ингибиторного действия с увеличением длины алкильного радикала ТАА от CH_3 до C_4H_9 —в 120 раз, тогда как для АХЭ и БуХЭ—только в 36 и 26 раз соответственно. Сравнение величин K_i для взаимодействия растворимой и мембранной ХЭ мозга капустных мух с ионами ТАА выявило большую чувствительность (в 2 раза) мембранной формы фермента к этим ионам.

Как известно, активный центр АХЭ (КФ 3.1.1.7) и БуХЭ (КФ 3.1.1.8) состоит из двух участков—эстеразного и анионного. Последний осуществляет связывание молекул катионных лигандов, субстратов и ингибиторов, за счет ион-ионного взаимодействия с катионной группой [1]. Связывание катионных лигандов осуществляется также анионными группами вне активного центра, составляющими регуляторный центр ХЭ [2, 3]. В непосредственной близости от эстеразного и анионного участков расположены гидрофобные области, способствующие сорбции молекул субстратов и ингибиторов путем гидрофобных взаимодействий и в значительной степени определяющие специфичность ХЭ [4, 5].

В НС позвоночных животных присутствует, как правило, АХЭ, в то время как у беспозвоночных обнаружены ХЭ с иной субстратной специфичностью [6], что может быть связано с различием в структуре отдель-

ных участков активного центра ХЭ. Так, установлено, что ХЭ мозга насекомых *Insecta*, комнатных мух *Musca domestica* (отряд *Diptera*) обладает более обширными гидрофобными областями вблизи анионного участка и, возможно, большим расстоянием между анионным и эстеразным участками активного центра, чем АХЭ млекопитающих [7, 8].

Настоящая работа является продолжением исследования свойств ХЭ мозга весенней капустной мухи *Delia brassicae*, другого представителя отряда *Diptera*, являющегося вредителем сельскохозяйственных культур [9, 10]. Целью работы было изучение роли анионного участка и структуры его гидрофобных областей в активном центре ХЭ мозга капустной мухи с помощью различных катионных лигандов—ионов ТАА и производных пиридиния, сравнение полученных данных с действием этих соединений на ХЭ млекопитающих—АХЭ и БуХЭ для выявления особенностей фермента мозга капустных мух.

Материалы и методы

Источником растворимой и мембраносвязанной форм ХЭ служили головы весенней капустной мухи *Delia brassicae*. Использовали лабораторную культуру мух, выращенных на базе Всесоюзного научно-исследовательского института защиты растений. После препарирования готовили гомогенат голод (15 мг ткани/мл буфера) на 0,025 М фосфатном буфере, pH 7,5 и ультрацентрифугировали его на ультрацентрифуге УР-65 при 100 000 g в течение 1 ч при температуре 1—3°. Полученный супернатант использовали как растворимую форму ХЭ. Для выделения мембраносвязанной формы ХЭ из осадка готовили гомогенат и проводили его отмывание от растворимой ХЭ и обработку отмывого осадка 0,1%-ным Три-тоном X-100, как описано ранее [10]. Полученный после ультрацентрифугирования супернатант (100 000 g 1 ч) служил в качестве мембранной формы ХЭ.

Источниками АХЭ из эритроцитов крови быка и БуХЭ из сыворотки крови лошади являлись коммерческие препараты производства Пермского научно-исследовательского института вакцин и сывороток с величиной У. А. 0,8 и 13,6 Е/мг белка соответственно.

В качестве субстратов использовали коммерческие препараты нодидов ацетилтиохолина (АТХ, «Chemapol», ЧССР) и бутирилтиохолина (БуТХ, «Merck», ФРГ). Ингибиторами служили коммерческие препараты тетраметиламмонийиодида (ТМА, «Chemapol», ЧССР), тетраэтиламмонийиодида (ТЭА, «Chemapol», ЧССР) и тетрабутиламмонийбромид (ТБА, «Chemapol», ЧССР), а также производные пиридиния—N-метилпиперидинийиодид (ИМ—2) и 1, 2, 4-триметилпиперидинийиодид (ИМ—3), синтезированные Абдувахобовым А. А. (Институт биоорганической химии УзССР, Ташкент).

Активность ХЭ определяли спектрофотометрическим методом по Ellman и соавт. [11]. В качестве хромогена использовали 5,5'-дитиобис (2-нитробензойную) кислоту (ДТНБ, Koch-Light Laboratory, Англия).

Реакционная проба объемом 1 мл включала фермент, субстрат и 0.04 М фосфатный буфер, pH 7.5. Реакцию запускали добавлением субстрата после предварительной инкубации фермента в отсутствие и в присутствии ингибитора при 25°. После остановки реакции 1 мМ раствором Гд-42 (0.5 мл) добавляли 0.5 мл 2 мМ раствора ДТНБ и измеряли величину оптического поглощения при $\lambda = 412$ нм в односантиметровой кювете спектрофотометра СФ-46. По калибровочной кривой определяли количество подвергшегося гидролизу субстрата. Активность выражали в моль субстрата, подвергшегося гидролизу в 1 мин/мг белка.

Кинетические параметры для гидролиза субстрата—V и K_m рассчитывали по методу Лайнуивера-Берка [12]. Диапазон концентраций субстратов для ХЭ мух и АХЭ был $5 \cdot 10^{-5}$ — $1 \cdot 10^{-3}$ М АТХ, для БУХЭ— $4 \cdot 10^{-4}$ — $2 \cdot 10^{-3}$ М БУТХ. При исследовании взаимодействия ХЭ с ингибиторами измеряли скорости гидролиза субстратов в заданном диапазоне концентраций в отсутствие ингибитора и при 3—4 различных его концентрациях.

Величину K_i для диссоциации фермент-ингибиторного комплекса определяли по методу Диксона, Уэбба [12]. Идентификацию типа обратимого ингибирования проводили по графикам Лайнуивера-Берка для ферментативного гидролиза субстрата в присутствии и в отсутствие ингибитора [12]. В случае смешанного типа торможения конкурентную компоненту K'_i и бесконкурентную компоненту K''_i рассчитывали методом Krupka [13] по формулам:

$$K'_i = \frac{[I]}{(tgz_2/tgz_1) - 1}, \quad K''_i = \frac{[I]}{V_0/V_1 - 1},$$

где [I]—концентрация ингибитора, tgz_2 , tgz_1 —угловые коэффициенты прямой зависимости $1/v$ от $1/S$, полученные в отсутствие (tgz_1) и в присутствии (tgz_2) ингибитора, V_0 и V_1 —максимальные скорости гидролиза субстратов в отсутствие и при концентрации ингибитора [1].

Вклад бесконкурентной составляющей оценивали с помощью коэффициента α , который рассчитывали по отношению K'_i и K''_i . Чем больше величина α , тем больше вклад бесконкурентной компоненты в ингибирование.

Содержание белка определяли по методу Lowry и соавт. [14].

Результаты и обсуждение

Результаты взаимодействия ионов ТАА с ХЭ мозга капустных мух представлены в табл. 1 и на рис. 1, 2. О силе действия этих обратимых ингибиторов судили по величине K_i . Величины ингибиторных констант для взаимодействия АХЭ и БУХЭ с ионами ТАА (табл. 2) несущественно отличаются от имеющихся в литературе, полученных при использовании других субстратов в сходных условиях среды (pH 7.5, 25°), а также при определении активности ферментов другими методами [15—17]. Значения K_i для взаимодействия ХЭ мух с ТМА и ТЭА оказались сходными с таковыми для АХЭ и примерно в 4 раза ниже по сравнению с K_i

Таблица 1

Кинетические параметры для взаимодействия растворимой ХЭ мозга гаустных
мух с ионами тетраалкиламмония (рН 7,5,25°; фосфатный буфер 0,04 М)

Ингибитор	Концентрация ингибитора, М	K_m , М · 10 ³	V , М · мин ⁻¹ · 10 ³ · мг белка ⁻¹	K_i , М	K_i' , М	K_i'' , М	α
ТМА	0	4,8	10,5				
$(CH_3)_4N^+I^-$	$4 \cdot 10^{-4}$	6,3	9,5	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(8,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(9,2 \pm 0,8) \cdot 10^{-3}$	0,10
	$1 \cdot 10^{-3}$	7,7	9,0				
	$2 \cdot 10^{-3}$	9,0	8,3				
	$4 \cdot 10^{-3}$	11,0	8,0				
ТЭА	0	4,8	10,3				
$(C_2H_5)_4N^+I^-$	$2 \cdot 10^{-4}$	7,4	10,3	$(6,3 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	$(6,4 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$		
	$4 \cdot 10^{-4}$	8,7	10,3				
	$2 \cdot 10^{-3}$	13,0	10,3				
ТБА	0	5,5	9,4				
$(C_4H_9)_4N^+Br^-$	$2 \cdot 10^{-6}$	7,1	8,3	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-5}$	$(7,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-6}$	$(3,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	0,23
	$4 \cdot 10^{-6}$	8,0	7,8				
	$1 \cdot 10^{-5}$	13,0	6,1				

Таблица 2

Кинетические параметры для взаимодействия АХЭ и БуХЭ с ионами тетраакиламмония (рН 7,5; 25°; фосфатный буфер 0,04 М)

Фермент	Ингибитор	Концентрация ингибитора, М	K_m , М	V , М·мин ⁻¹ мг белка ⁻¹	K_i , М	K'_i , М	K''_i , М	α
АХЭ	ТМА	0	$0,9 \cdot 10^{-4}$	$2,4 \cdot 10^{-7}$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(9,4 \pm 1,0) \cdot 10^{-5}$	$(4,2 \pm 0,7) \cdot 10^{-3}$	0,22
		$9,1 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$2,3 \cdot 10^{-7}$				
		$1,8 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$				
		$4,5 \cdot 10^{-3}$	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-7}$				
	ТЭА	0	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$	$(6,7 \pm 0,6) \cdot 10^{-4}$	$(3,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(1,4 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	0,22
		$3,0 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-7}$				
		$9,1 \cdot 10^{-4}$	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-7}$				
		$1,8 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-4}$	$1,0 \cdot 10^{-7}$				
	ТБА	0	$0,9 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$	$(3,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$	$(2,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$(9,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-5}$	0,21
		$1,0 \cdot 10^{-3}$	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-7}$				
		$2,0 \cdot 10^{-3}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$1,6 \cdot 10^{-7}$				
		$4,0 \cdot 10^{-3}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$				
БуХЭ	ТМА	0	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$4,3 \cdot 10^{-6}$	$(4,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$(4,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(3,0 \pm 0,3) \cdot 10^{-2}$	0,14
		$1,6 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-6}$				
		$2,4 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$				
		$8,0 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$3,4 \cdot 10^{-6}$				
	ТЭА	0	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^{-6}$	$(2,2 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	$(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$		
		$8,0 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^{-6}$				
		$4,0 \cdot 10^{-3}$	$4,3 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^{-6}$				
		$8,0 \cdot 10^{-3}$	$7,1 \cdot 10^{-4}$	$5,2 \cdot 10^{-6}$				
	ТБА	0	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-6}$	$(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(1,6 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(4,9 \pm 0,8) \cdot 10^{-4}$	0,33
		$4,0 \cdot 10^{-3}$	$2,6 \cdot 10^{-4}$	$3,5 \cdot 10^{-6}$				
		$8,0 \cdot 10^{-3}$	$2,9 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-6}$				
		$4,0 \cdot 10^{-4}$	$3,8 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-6}$				

для БуХЭ. На основании этих данных можно считать, что при взаимодействии ХЭ мух, как и АХЭ, с катионными лигандами важную роль играет мулоновское взаимодействие катионной группировки с анионным участком фермента. Известно, что анионный участок в активном центре АХЭ играет значительно большую роль, чем у БуХЭ [1]. Можно считать, что по значению анионного участка ХЭ мух сходна с АХЭ.

Как видно из табл. 1 и 2, увеличение размера алкильных радикалов ионов ТАА увеличивает их сродство ко всем трем ферментам. Однако при переходе от ТМА к ТБА чувствительность ХЭ мух к этим лигандам возрастает примерно в 120 раз, в то время как АХЭ только в 36 раз, а БуХЭ—в 26 раз. Полученные данные находятся в соответствии с результатами Кирпка, Hellenbrand для ХЭ мозга комнатных мух [7, 16, 18] и могут свидетельствовать о более обширных гидрофобных областях в непосредственной близости анионного центра ХЭ мух по сравнению с АХЭ и БуХЭ.

Кривые зависимости активности растворимой ХЭ мозга капустных мух от концентрации тохолинсовых эфиров имеют максимум при концентрации 0,8—1 мМ субстрата, что указывает на угнетение ферментативного действия избытком субстрата [9]. В присутствии ионов ТАА и соединения IM-2 в области высоких концентраций субстрата, где наблюдается эффект субстратного торможения, под действием исследуемых лигандов происходит некоторое снижение этого эффекта (рис. 1). Для АХЭ высказано предположение об участии аллостерического центра в субстратном торможении [2, 19—21]. Вероятно, наблюдаемый нами эффект уменьшения субстратного торможения для ХЭ капустных мух обусловлен конкуренцией этих лигандов с катионной группой АТХ за взаимодействие с аллостерическим центром ХЭ мух, в результате чего характерное для ХЭ капустных мух в зоне высоких концентраций субстрата снижение каталитической активности менее выражено. Эти данные указывают на присутствие аллостерического центра и его регуляторную роль в механизме каталитического действия ХЭ мух. Сходные результаты для взаимодействия ХЭ мозга комнатных мух с субстратами и обратимыми ингибиторами получены Hellenbrand, Кирпка [22, 18].

Идентификацию типа обратимого ингибирования проводили на основании графического метода Лайнуивера-Берка [12]. В случае смешанного типа торможения вклад конкурентной и бесконкурентной компонент оценивали величинами K_i' —константы конкурентного ингибирования и K_i'' —бесконкурентного ингибирования. При взаимодействии ХЭ мух с ТМА и ТЭА выявлялся конкурентный тип действия этих ионов. ТЭА является истинно конкурентным ингибитором, так как при его действии на фермент $V_{\max}$ не меняется, происходит только увеличение K_m в 3 раза (рис. 2, б). Это означает, что ТЭА взаимодействует только со свободным активным центром фермента и препятствует образованию комплекса Михаэлиса АТХ с ХЭ. В случае ТМА наблюдается увеличение K_m в 2 раза и незначительное снижение $V_{\max}$ (в 1,2 раза). Прямые на графике Лайнуивера-Берка пересекаются в верхнем левом квадранте вблизи оси ординат.

нат (рис. 2. а). При этом K_i'' в 10 раз превышает $K_i' (\alpha=0.1)$. Этот тип ингибирования близок к конкурентному, так как вклад бесконкурентной компоненты значительно ниже конкурентной. Взаимодействие ХЭ мух с ТБА смешанного типа и характеризуется величиной K_i'' , превышающей

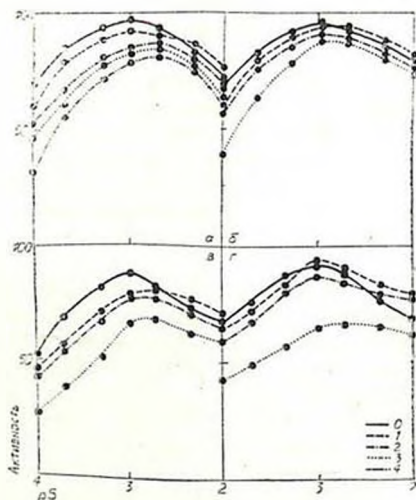


Рис. 1. Зависимость рS-активности для гидролиза АТХ под действием ХЭ мозга капустных мух в отсутствие ингибитора (0) и при разных концентрациях ТМА (а), ТЭА (б), ТБА (в), IM-2 (г). По оси абсцисс—отрицательный логарифм концентрации АТХ, по оси ординат—скорость гидролиза $A(M \cdot 10^9 \cdot \text{мин}^{-1} \cdot \text{мг} \cdot \text{См}^{-1} \cdot \text{с}^{-1})$. а—концентрации ТМА— $4 \cdot 10^{-4} M$ (1), $1 \cdot 10^{-3} M$ (2), $2 \cdot 10^{-3} M$ (3), $4 \cdot 10^{-3} M$ (4). б—концентрации ТЭА— $2 \cdot 10^{-1} M$ (1), $4 \cdot 10^{-4} M$ (2), $2 \cdot 10^{-3} M$ (3). в—концентрации ТБА— $2 \cdot 10^{-6} M$ (1), $4 \cdot 10^{-6} M$ (2), $1 \cdot 10^{-5} M$ (3). г—концентрации IM-2— $2 \cdot 10^{-5} M$ (1), $4 \cdot 10^{-5} M$ (2), $4 \cdot 10^{-4} M$ (3).

K_i' в 4,4 раза ($\alpha=0,23$). При смешанном типе торможения может происходить присоединение иона ТАА не только к свободному активному центру фермента, но и к ацетилированному ферменту, у которого свободен анионный участок [22], ион ТАА может сорбироваться также на аллостерическом центре, периферических анионных участках ХЭ вне активного центра [2, 21, 23]. Для БухЭ механизм взаимодействия с ионами ТАА близок к таковому для ХЭ мух. Для АХЭ исследуемые ионы являются ингибиторами смешанного типа действия, при этом отношения конкурентных компонент торможения к бесконкурентным варьируют в пределах 0,22—0,27. Анализ полученных данных свидетельствует о большей близости ХЭ мух к БухЭ по типу обратимого действия ТАА.

В табл. 3 приведены результаты взаимодействия мембранной формы ХЭ мух с ионами ТМА и ТБА. Как видно из табл. 1 и 3, величины K_i

Таблица 3

Кинетические параметры для взаимодействия мембранной формы АХЭ мозга капустных
мух с тетраметиламмонием (ТМА) и тетрабутиламмонием (ТБА)
(рН 7,5; 25°, фосфатный буфер 0,04 М)

Ингибитор	Концентрация ингибитора, М	K_m , М	V , $M \cdot \text{мин}^{-1}$ мг белка $^{-1}$	K_i , М	K_i' , М	K_i'' , М	α
ТМА	0	$6,7 \cdot 10^{-5}$	$31,0 \cdot 10^{-8}$	$(6,0 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(2,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	$(1,8 \pm 0,2) \cdot 10^{-6}$	0,13
	$8,0 \cdot 10^{-5}$	$9,0 \cdot 10^{-5}$	$30,0 \cdot 10^{-8}$				
	$4,0 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$26,2 \cdot 10^{-8}$				
	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$21,4 \cdot 10^{-8}$				
ТБА	0	$6,5 \cdot 10^{-5}$	$25,0 \cdot 10^{-8}$	$(5,6 \pm 0,7) \cdot 10^{-6}$	$(5,1 \pm 0,7) \cdot 10^{-6}$	$(2,1 \pm 0,3) \cdot 10^{-6}$	0,24
	$2,0 \cdot 10^{-4}$	$9,0 \cdot 10^{-5}$	$23,0 \cdot 10^{-8}$				
	$8,0 \cdot 10^{-4}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$21,5 \cdot 10^{-8}$				
	$1,6 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$18,0 \cdot 10^{-8}$				

для мембранной ХЭ примерно в 2 раза ниже, чем для растворимой ХЭ, то есть мембранная форма фермента оказалась чувствительней растворимой формы к действию ТАА ионов. По механизму действия ионов ТАА обе формы ХЭ близки.

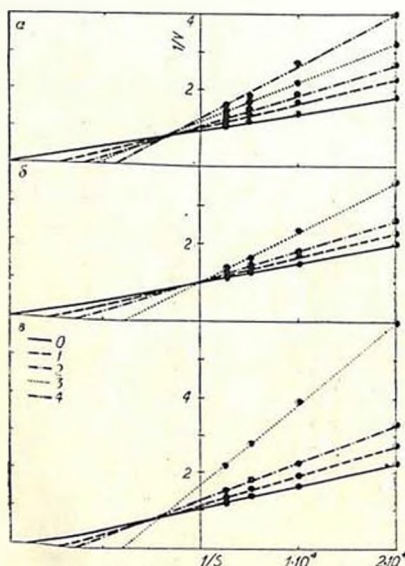
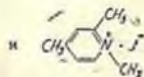
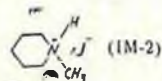


Рис. 2. Зависимость $1/v$ ($M^{-1} \cdot 10^{-i} \cdot \text{мин} \cdot \text{мг}$ белка) от $1/S$ (M^{-1}) для гидролиза АТХ под действием ХЭ мозга капустных мух в отсутствие ингибитора (0) и при разных концентрациях ТМА (а), ТЭА (б), ТБА (в). а—концентрации ТМА— $1 \cdot 10^{-4} M$ (1), $1 \cdot 10^{-3} M$ (2), $2 \cdot 10^{-3} M$ (3), $4 \cdot 10^{-4} M$ (4). б—концентрации ТЭА— $2 \cdot 10^{-4} M$ (1), $4 \cdot 10^{-4} M$ (2), $2 \cdot 10^{-3} M$ (3). в—концентрации ТБА— $2 \cdot 10^{-6} M$ (1), $4 \cdot 10^{-6} M$ (2), $1 \cdot 10^{-5} M$ (3)

Для характеристики анионного центра ХЭ мух изучали также действие производных пиридиния ИМ-2 и ИМ-3 на активность фермента. Эти соединения являются обратимыми ингибиторами ХЭ, так как уровень торможения активности фермента устанавливается сразу после добавления ингибитора, зависит от концентрации ингибитора и не нарастает во времени. ИМ-2 и ИМ-3 оказались высоко эффективными ингибиторами ХЭ мух (табл. 4). Ингибитор ИМ-2 действовал, как и в случае БуХЭ, по истинно конкурентному типу. Он был на порядок сильнее, чем для БуХЭ. ИМ-3 проявлялся наиболее эффективно при действии на АХЭ, с истинно конкурентным типом ингибирования. Его действие на АХЭ в 5 раз превышало таковое для ХЭ мух и в 170 раз—для БуХЭ. ИМ-3 ингибировал ХЭ мух и БуХЭ по смешанному типу. При анализе этих данных видно.

Кинетические параметры для взаимодействия ХЭ мух, АХЭ и БухЭ с производными пиридиния



(рН 7,5; 25°, фосфатный буфер 0,04 М)

Фермент	Ингиби- тор	Концентрация ингибитора, М	K_m , М	V , М·мин ⁻¹ мг белка ⁻¹	K_i , М	K_i' , М	K_i'' , М	α
ХЭ мух	IM-2	0	$5,5 \cdot 10^{-5}$	$9,5 \cdot 10^{-4}$				
		$2 \cdot 10^{-5}$	$1,2 \cdot 10^{-4}$	$9,5 \cdot 10^{-4}$				
		$4 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$9,5 \cdot 10^{-4}$	$(3,2 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$	$(3,5 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$		
		$8 \cdot 10^{-5}$	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$9,5 \cdot 10^{-4}$				
	IM-3	$4 \cdot 10^{-4}$	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$9,5 \cdot 10^{-4}$				
		0	$5,3 \cdot 10^{-5}$	$9,0 \cdot 10^{-4}$				
		$4 \cdot 10^{-6}$	$8,3 \cdot 10^{-5}$	$8,4 \cdot 10^{-4}$	$(1,7 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(5,9 \pm 0,6) \cdot 10^{-3}$	0,2
		$8 \cdot 10^{-6}$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	$7,9 \cdot 10^{-4}$				
АХЭ	IM-2	$4 \cdot 10^{-5}$	$1,7 \cdot 10^{-4}$	$6,9 \cdot 10^{-4}$				
		0	$0,9 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$				
		$4 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-4}$	$1,8 \cdot 10^{-7}$	$(2,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(1,2 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$(6,1 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$	0,2
		$8 \cdot 10^{-5}$	$1,3 \cdot 10^{-4}$	$1,4 \cdot 10^{-7}$				
	IM-3	$4 \cdot 10^{-4}$	$1,5 \cdot 10^{-4}$	$1,2 \cdot 10^{-7}$				
		0	$1,0 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$				
		$8 \cdot 10^{-7}$	$1,8 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$	$(3,5 \pm 0,1) \cdot 10^{-4}$	$(2,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-4}$		
		$1 \cdot 10^{-6}$	$2,7 \cdot 10^{-4}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$				
БухЭ	IM-2	$4 \cdot 10^{-5}$	$1,0 \cdot 10^{-3}$	$2,1 \cdot 10^{-7}$				
		0	$2,1 \cdot 10^{-4}$	$4,8 \cdot 10^{-6}$				
		$4 \cdot 10^{-4}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$	$4,8 \cdot 10^{-6}$	$(1,6 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	$(1,9 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$		
		$2 \cdot 10^{-3}$	$3,3 \cdot 10^{-4}$	$4,8 \cdot 10^{-6}$				
	IM-3	$4 \cdot 10^{-3}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$4,8 \cdot 10^{-6}$				
		0	$2,2 \cdot 10^{-4}$	$4,3 \cdot 10^{-6}$				
		$8 \cdot 10^{-5}$	$2,4 \cdot 10^{-4}$	$4,0 \cdot 10^{-6}$	$(6,1 \pm 0,2) \cdot 10^{-4}$	$(4,7 \pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$(1,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	0,5
		$4 \cdot 10^{-4}$	$2,5 \cdot 10^{-4}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$				
		$8 \cdot 10^{-4}$	$2,9 \cdot 10^{-4}$	$2,7 \cdot 10^{-6}$				

что по механизму действия соединений IM-2 и IM-3 на исследуемые ферменты наблюдается сходство между ХЭ мух и БуХЭ. Однако большая разница, выше чем на порядок, в действии этих ионов на ХЭ мух по сравнению с БуХЭ является подтверждением более важной роли анионного участка в сорбции на активном центре ХЭ, чем БуХЭ. Высокое сродство ХЭ мух к производным пиридиния позволяет предположить наличие вблизи анионного центра зон, комплементарных циклическим структурам этих соединений.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что активный центр ХЭ капустных мух содержит анионный участок, роль которого в сорбции таких специфических катионсодержащих лигандов, как ионы ТАА, весьма существенна, и по силе ион-ионного взаимодействия он близок к анионному участку АХЭ бычьих эритроцитов. Вместе с тем, ХЭ мух более сходна с типичной БуХЭ млекопитающих, чем с АХЭ, по механизму действия ионов ТАА на их активность. Сравнительный анализ величин K_i для ТАА ионов с различной длиной алкильного радикала $\text{CH}_3 \rightarrow \text{C}_2\text{H}_5 \rightarrow \text{C}_4\text{H}_9$ показал больший рост при увеличении радикала силы их взаимодействия с ХЭ капустной мухи, чем с АХЭ и БуХЭ, что позволило заключить о более обширных гидрофобных областях в анионном участке ХЭ мух по сравнению с таковыми АХЭ и БуХЭ. Результаты, полученные при взаимодействии ХЭ мух с производными пиридиния, указывают на присутствие вблизи анионного участка ХЭ мух областей, комплементарных циклической структуре этих соединений. Снижение эффекта субстратного торможения активности фермента под действием ионов ТАА и соединения IM-2, а при их низких концентрациях в некоторых случаях активация фермента свидетельствуют о наличии аллостерического центра и его регуляторной роли для ХЭ капустных мух.

INTERACTION OF CHOLINESTERASE FROM BRAIN OF THE CABBAGE FLY *DELIA BRASSICAE* WITH CATIONIC LIGANDS

T. I. KRASNOVA, G. M. GRIGOR'eva, A. E. KHOVANSKIKH,
I. P. LEZHNEVA

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, USSR Academy of Sciences, Leningrad, All-Union Research Institute of Plant Protection, VASKHNIL, Leningrad

We studied the interaction of cholinesterase (ChE) from brain of the spring cabbage fly *Delia brassicae*, AChE (EC. 3.1.1.7.) from human erythrocytes and BuChE (EC. 3.1.1.8.) from horse blood serum with tetraalkylammonium (TAA) ions: tetramethylammonium, tetraethylammonium, tetrabutylammonium as well as pyridinium derivatives-N-methylpyridinium and 1,2,4-trimethylpyridinium. The effects of these ions were assessed in terms of the inhibition constant K_i . All ligands used were reversible inhibitors of the studied ChE's. Comparative analysis of the K_i values obtained for different enzymes showed that the fly

ChE was similar to AChE in terms of the inhibition by TAA ions. At the same time the fly ChE was more similar to BuChE as regards the interaction mechanism with the ions. Considerable similarity was also found between fly ChE and BuChE in their interaction with pyridinium derivatives. Comparison of the K_i values for the interaction of the soluble and membrane bound ChE of cabbage fly brain with TAA ions showed the two fold greater affinity of these ions to the membrane-bound form of the enzyme.

ЛИТЕРАТУРА

1. Яковлев В. А.—В кн.: Кинетика ферментативного катализа, с. 138—246, М., Наука, 1965.
2. Changeux J. P. Mol. Pharmacol., № 4, p. 369—392, 1966.
3. Rosenberry T. L. Adv. Enzymol., v. 43, p. 103—218, 1975.
4. Кабачник М. И., Абдувахобов А. А., Атабекова И. И., Бресткин А. П., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Година Е. Н., Михайлов С. С., Михельсон М. Я., Розенберг В. И., Розенберг Е. В., Ситкович Р. В. Успехи химии, т. 39, вып. 6, с. 1050—1072, 1970.
5. Григорьева Г. М., Коннычева Н. В., Абдувахобов А. А. Биооргани. химия, т. 9, № 8, с. 1040—1046, 1983.
6. Brestkin A. P., Brick I. L., Grigorjeva G. M.,—In: Intern. En cycl. Pharm. Therap., sect. 85, v. 1, p. 241—344, New York, London, Acad. Press, 1973.
7. Hellenbrand K., Krupka R. M. Croat. Chem. Acta, v. 47, № 3, p. 345—353, 1975.
8. Розенберг В. И., Шерстобитов О. Е. Нейрохимия, т. 4, № 2, с. 214—226, 1975.
9. Григорьева Г. М., Краснова Т. И., Хованских А. Е. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 23, № 1, с. 141—143, 1987.
10. Григорьева Г. М., Краснова Т. И., Хованских А. Е., Гусев Г. В., Лежнева И. П. Биохимия, т. 52, вып. 8, с. 1192—1200, 1987.
11. Ellman G. L., Courtney K. D., Andres Jr. V., Featherstone R. M. Biochem. Pharmacol., v. 7, № 1, p. 88—89, 1961.
12. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты, с. 289—292, М., Мир, 1966.
13. Krupka R. M. Biochem., v. 3, № 4, p. 1749—1755, 1964.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
15. Григорьева Г. М. О роли аминокислотного центра активной поверхности холинэстераз. Автореф. канд. дис., А., 1965.
16. Krupka R. M., Hellenbrand K. Biochim. et biophys. acta, v. 370, № 1, p. 207—215, 1974.
17. Бресткин А. П., Виняр Т. Н., Розенберг Е. В. Биохимия, т. 46, вып. 6, с. 1042—1043, 1981.
18. Krupka R. M. Biochim. et biophys. acta, v. 370, № 1, p. 197—207, 1974.
19. Aldridge W. N., Reiner E. Biochem. J., v. 115, № 2, p. 147—162, 1964.
20. Changeux J. P., Leuzinger W., Huchet M. FEBS Lett., v. 2, p. 77—83, 1968.
21. Kitz R. J., Bruswell L. M., Ginsburg S. Mol. Pharmacol., v. 6, № 2, p. 106—121, 1970.
22. Hellenbrand K., Krupka R. M. Biochem., v. 9, № 21, p. 4665—4672, 1970.
23. Rosenberry T. L. Croat. Chem. Acta, v. 47, № 3, p. 235—250, 1975.

Поступила 19. III 1988



УДК 577.151:642

КООРДИНИРОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ МОДУЛЯТОРОВ
РАСТВОРИМОЙ ФОСФАТЗАВИСИМОЙ ГЛУТАМИНАЗЫ
МОЗГА ТРИЙОДО-L-ТИРОНИНОМ

ОГАНЕСЯН В. С., БАДАЛЯН А. А., БЕДЖАНЫАН К. Д.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Установлено, что в присутствии трийодо-L-тиронина, фосфата и какого-нибудь третьего модулятора—цитрата, сукцината, аспартата или ацетиласпартата активность растворимой глутаминазы мозга сильно повышается. Любое другое тройное сочетание модуляторов либо вовсе не повышает активность фермента, либо повышает незначительно. При сочетанном применении 4-х различных модуляторов с обязательным наличием в среде фосфата и трийодо-L-тиронина эффективность действия двух других модуляторов зависит от характера взаимоотношений между ними и каждому модулятору принадлежит определенное место в этом сложном процессе.

Деамидирование глутаминна в мозговой ткани, осуществляемое фосфатзависимой глутаминазой (ФЗГ), активируется целым рядом соединений физиологической природы и носит сложный и поливалентный характер [1—5]. Регуляторные свойства мембраносвязанной (МСГ) и растворимой (РГ) форм ФЗГ во многом принципиально отличаются [6—9]. Среди множества эффекторов этих молекулярных форм фермента особое место занимают тиреоидные гормоны (ТГ) [2, 9—11]. Как тироксин (T_4), так и трийодо-L-тиронин (T_3), добавленные в отдельности, практически не стимулируют активность РГ мозга, хотя и являются эффективными аллостерическими активаторами МСГ [8, 9]. Цитрат, сукцинат, малеат и другие эффекторы МСГ также не влияют на активность РГ. Однако сочетанное применение фосфата, единственного эффективного активатора РГ, цитрата, сукцината, аспартата (АК) и других соединений с T_3 приводит к многократному повышению активности фермента [9]. Следует отметить, что в этой сложной системе, обеспечивающей регуляцию глутаминазы, первостепенное значение приобретает характер взаимоотношений различных модуляторов.

Задачей настоящего исследования явились поиски условий для эффективного стимулирования активности РГ, выяснение индивидуальных особенностей действия отдельных модуляторов и их взаимоотношений, а также места и значения каждого эффектора в общей системе регуляции этого фермента.

Материалы и методы

Митохондриальную фракцию, выделенную из коры мозга беспородных крыс массой 150—200 г по ранее описанной методике [12], промывали в ледяной бидистиллированной воде и центрифугировали при 17000 г в течение 20 мин. Полученный осадок суспендировали в воде, затем подвергали 6-кратному замораживанию-размораживанию. Взвесь митохондриальной фракции можно хранить при -20° в течение нескольких суток. Размороженную митохондриальную фракцию центрифугировали при 20000 г в течение 70 мин. Полученную таким путем прозрачную, слегка опалесцирующую надосадочную жидкость использовали в качестве источника РГ.

Инкубационная смесь в объеме 1,5 мл содержала 0,4 мл ферментного препарата (около 400 мкг белка); 0,5 мл 0,2 М трис-НСI буфера pH 8,0; 20 мМ L-глутамин и, в зависимости от поставленной задачи, различные активаторы в следующих концентрациях: фосфат—10 мМ, АТР—10 мМ, цитрат, сукцинат, ацетиласпартат (ААК) и АК—по 50 мМ. Растворы этих соединений дозодили NaOH до соответствующего pH. Концентрации тиреоидных соединений— T_1 («Reanal», Венгрия), T_3 («Koch-Light», Англия), диiodo-L-тиронина (T_2) («Sigma», США), 3, 3', 5-триiodоти-реоуксусной кислоты (T_2 -УК) («Sigma», США) в опытах варьировали от 0,001 до 0,04 мМ. Гормональные препараты растворяли добавлением 0,01 н. NaOH (pH 10,0). Реакционную смесь инкубировали 30 мин при 37° и постоянном встряхивании. Реакцию останавливали добавлением 0,3 мл 10%-ной ТХУ. О глутаминазной активности судили по количеству образовавшегося аммиака, который определяли микродиффузионным методом [13]. Количество белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [14].

Результаты и обсуждение

Как было отмечено выше, T_3 многократно усиливает действие различных модуляторов на активность РГ, однако для проявления эффекта потенцирования необходимы его относительно высокие концентрации (0,02—0,05 мМ). Для выявления условий, при которых действие T_3 проявлялось бы и при применении его низких концентраций, мы изучали влияние трех различных эффекторов на глутаминазу—низких концентраций T_3 фосфата и какого-либо третьего модулятора.

Как показывают данные, представленные на рис. 1, а, при применении каждого эффектора в отдельности только в присутствии фосфата (10 мМ) наблюдается повышение активности фермента. При сочетании применения фосфата с цитратом, сукцинатом, АК или ААК происходит слабое потенцирование их действия (начальные точки кривых, рис. 1, а), а в случае сочетания этих соединений с T_3 потенцирования практически не наблюдается. В то же время в присутствии 0,005 мМ T_3 одновременное применение фосфата с третьим ингредиентом уже приводит к значительному повышению активности глутаминазы, а при концентрации гормо-

на—0,01 мМ активность фермента многократно возрастает. Среди модуляторов, применяемых в качестве третьего ингредиента, наиболее эффективным оказался цитрат.

В настоящее время известен целый ряд низкомолекулярных соединений различной природы, эффективно стимулирующих активность МСГ мозга и почек [15—17]. Среди фосфоорганических соединений АТР является одним из эффективных стимуляторов глутаминазы мозга. Следующая серия опытов проводилась с АТР с целью выяснения его взаимоотношений с гормонами и другими эффекторами.

Данные, представленные на рис. 1, б, показывают, что АТР, добавленный в концентрации 10 мМ, стимулирует активность РГ примерно так же, как и P_1 . Его сочетание с цитратом, сукцинатом, АК или ААК приводит к незначительному повышению активности фермента. В присутствии 0,001 мМ T_3 усиления стимулирующего влияния АТР не происходит, между тем как добавление третьего модулятора приводит к заметному повышению активности глутаминазы. Многократное усиление её активности наблюдается в случае применения 0,02 мМ T_3 . В опытах с АТР модуляторы, испытанные в качестве третьего ингредиента, почти одинаково эффективны. Из этих данных следует, что для РГ P_1 является более эффективным модулятором, чем АТР.

Необходимо отметить, что, в отличие от T_3 , сочетания достаточно высоких концентраций T_4 с другими модуляторами не приводят к сколько-нибудь заметному стимулированию активности РГ [9]. Было интересно изучить действие T_4 на фермент при тройных сочетаниях модуляторов. Как выяснилось из проведенных исследований, сочетания T_4 фосфата и третьего модулятора приводят к повышению активности глутаминазы (рис. 1, в). Однако даже при применении относительно высоких концентраций T_4 его эффект, по сравнению с эффектом T_3 , выражен намного слабее.

Данные, приведенные на рис. 2, а, показывают, что в присутствии T_2 и фосфата действие других модуляторов также усиливается и что для стимулирования активности фермента и в этом случае необходимы высокие концентрации T_2 . Эффекты сукцината, АК и ААК в присутствии T_2 и фосфата усиливаются примерно в той же степени, что и в опытах с T_4 , а действие цитрата при применении с T_2 выражено заметно сильнее. Из полученных данных следует, что эффективность гормона зависит от количества атомов йода в его молекуле—как увеличение, так и уменьшение на атом йода в молекуле T_3 приводит к значительному снижению его стимулирующего действия на фермент. Наряду с этим выяснилось, что изменения в структуре боковой цепи T_3 также отражаются на его эффективности. Из результатов, приведенных на рис. 2, б, видно, что в присутствии фосфата применение T_3 УК с этими эффекторами активизирует глутаминазу сильнее, чем T_4 и T_2 , но по сравнению с действием T_3 оно выражено слабее. Необходимо отметить, что трийодо-d-тиронин, в отличие от трийодо-L-тиронина, вообще не действует на глутаминазу.

Таким образом, сочетания любого модулятора с низкими концентра-

циями T_3 не приводят к повышению активности глутаминазы, и в этих условиях для стимулирования активности необходимо наличие трех модуляторов— T_3 , фосфата и какого-либо третьего эффектора. В связи с этим возникает вопрос, могут ли сочетания двух других модуляторов с низкими концентрациями T_3 повышать активность глутаминазы, или же наличие фосфата, как третьего ингредиента реакционной смеси, обязательно. В следующей серии опытов мы изучали активность РГ при одновременном добавлении T_3 , цитрата и третьего модулятора. Как видно из

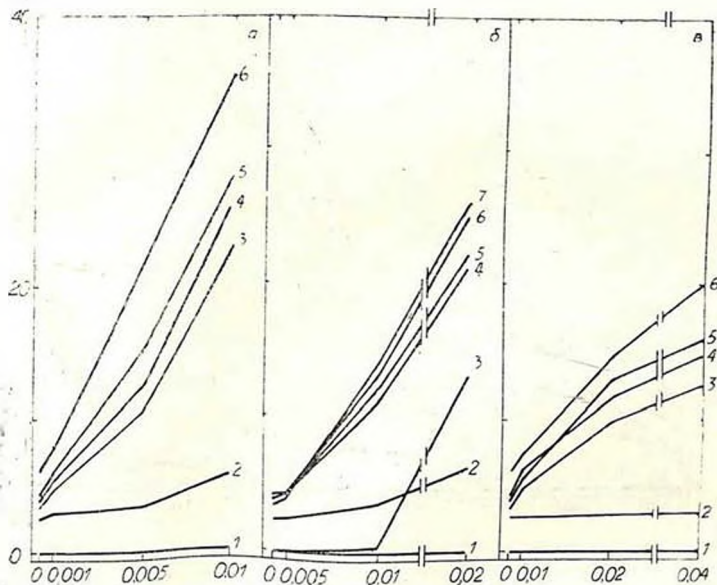


Рис. 1. Действие T_3 и T_4 на активность РГ мозга при применении различных сочетаний модуляторов: а—активность фермента в присутствии фосфата и T_3 : 1— T_3 +модулятор; 2— T_3 +фосфат; 3— T_3 +фосфат+ААК; 4— T_3 +фосфат+АК; 5— T_3 +фосфат+сукцинат; 6— T_3 +фосфат+цитрат; б—активность фермента в присутствии АТР и T_3 : 1— T_3 +модулятор; 2— T_3 +АТР; 3— T_3 +цитрат; 4— T_3 +АТР+ААК; 5— T_3 +АТР+АК; 6— T_3 +АТР+цитрат; 7— T_3 +АТР+сукцинат. в—активность фермента в присутствии фосфата и T_4 : 1— T_4 +модулятор; 2— T_4 +фосфат; 3— T_4 +фосфат+ААК; 4— T_4 +фосфат+АК; 5— T_4 +фосфат+сукцинат; 6— T_4 +фосфат+цитрат. По оси абсцисс—концентрация тиреоидных соединений; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка, $n=10-12$

данных, приведенных на рис. 2, в, при сочетанном применении сукцината, АК или ААК с цитратом и с T_3 активность глутаминазы практически не меняется и только в присутствии относительно высоких концентраций T_3

и цитрата происходит повышение активности фермента. Оказалось, что и в этих условиях добавление третьего ингредиента совместно с цитратом и T_3 не приводит к сколько-нибудь заметному изменению его активности. Надо отметить, что сочетание применение $AK + AAK$, $AK +$ сукцинат и $AAK +$ сукцинат с T_3 не приводит к повышению активности фермента.

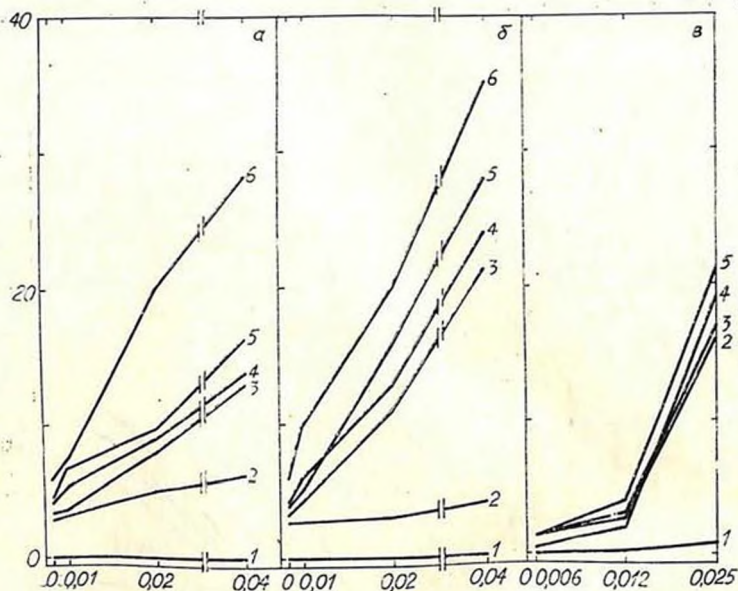


Рис. 2. Действие T_2 , T_3UK и T_3 на активность РГ мозга при применении различных сочетаний модуляторов. а) активность фермента в присутствии фосфата и T_2 : 1— T_2 +модулятор; 2— T_2 +фосфат; 3— T_2 +фосфат+ AAK ; 4— T_2 +фосфат+ AK ; 5— T_2 +фосфат+сукцинат; 6— T_2 +фосфат+цитрат. б) активность фермента в присутствии фосфата и T_3UK . 1— T_3UK +модулятор; 2— T_3UK +фосфат; 3— T_3UK +фосфат+ AAK ; 4— T_3UK +фосфат+ AK ; 5— T_3UK +фосфат+сукцинат; 6— T_3UK +фосфат+цитрат. в) активность фермента в присутствии цитрата и T_3 : 1— T_3 +модулятор; 2— T_3 +цитрат+ AAK ; 3— T_3 +цитрат+сукцинат; 4— T_3 +цитрат; 5— T_3 +цитрат+ AK . По оси абсцисс—концентрация тиреоидных соединений; по оси ординат—активность фермента, мкмоль NH_3 /мг белка, $n=10-12$

Итак, выяснилось, что в регуляции активности РГ важное значение имеют определенные сочетания модуляторов и не всякие тройные сочетания повышают активность фермента. Конечно, трудно сказать, сколько эффекторов участвуют в регуляции активности РГ в нервной клетке и какие возможные их сочетания чаще всего могут возникать. Тем не менее, надо полагать, что наиболее вероятный вариант—это одновременное уча-

ствие нескольких эффекторов в этом процессе. Однако следует отметить, что концентрация цитрата, сукцината, АК и ААК в клетке заметно ниже той, которая применялась в наших опытах. В связи с этим возникла необходимость выяснить, могут ли низкие концентрации этих модуляторов, добавленных одновременно, иметь такой же эффект, как высокая концентрация одного из них и какие взаимоотношения могут возникать между ними при применении более трех эффекторов.

Таблица

Влияние различных сочетаний модуляторов на активность растворимой фосфатзависимой глутаминазы мозга крыс (мкмоль $\text{NH}_3/\text{мг}$ белка)

Модуляторы, мМ		3, 3', 5-трийодо-L-тиронин, 0,01 мМ	Фосфат (10 мМ)	Фосфат (10 мМ)+ 3, 3', 5-трийодо-L-тиронин (0,01 мМ)
		0 (5)	2,8±0,1 (8)	4,9±0,3 (8)
Цитрат	10	0 (4)	3,8±0,3 (8)	15,0±0,9 (8)
	20	0 (4)	4,6±0,3 (8)	22,3±1,8 (8)
Сукцинат	10	0 (4)	3,0±0,2 (8)	9,3±0,8 (8)
	20	0 (4)	3,2±0,2 (8)	12,8±1,3 (8)
Аспартат	10	0 (4)	2,8±0,2 (6)	7,2±0,7 (6)
	20	0 (4)	2,9±0,2 (6)	10,0±1,2 (6)
Ацетиласпартат	10	0 (3)	2,8±0,2 (5)	8,80±0,96 (5)
	20	0 (3)	2,8±0,2 (5)	10,60±0,98 (5)
Цитрат+аспартат+сукци- нат+ацетиласпартат (по 10)		0,4 (5)	5,4±0,6 (5)	30,0±4,1 (5)
Цитрат+ацетиласпартат (по 10)		0 (4)	4,1±0,4 (6)	22,8±2,4 (6)
Цитрат+аспартат (по 10)		0 (3)	4,0±0,4 (6)	22,2±2,1 (6)
Цитрат+сукцинат (по 10)		0 (3)	4,2±0,4 (6)	21,4±2,3 (6)
Сукцинат+аспартат (по 10)		0 (3)	3,6±0,4 (6)	15,1±1,6 (6)
Аспартат+ацетиласпартат (по 10)		0 (3)	3,4±0,4 (6)	15,0±1,7 (6)
Сукцинат+ацетиласпартат (по 10)		0 (3)	3,5±0,3 (6)	14,2±2,3 (6)

Данные, приведенные в таблице, показывают, что в присутствии фосфата (10 мМ), T_3 (0,01 мМ) и четырех различных модуляторов с низкой концентрацией (10 мМ) происходит значительное повышение активности глутаминазы, между тем как в присутствии только фосфата они незначительно активируют фермент и никакого эффекта не оказывают при их сов-

местном добавлении с T_3 . Вместе с тем выяснилось, что при применении низких концентраций одного из этих модуляторов с фосфатом и T_3 сильнее всего активность глутаминазы повышается в присутствии цитрата, и лишь незначительно в присутствии АК стимулируется её активность. Однако из приведенных данных примечательным является то, что при сочетанном применении 10 мМ цитрата с 10 мМ АК, ААК или сукцината происходит потенцирование их действия и активность фермента достигает уровня, который наблюдается при применении 20 мМ цитрата. При сочетании применения 10 мМ сукцината с такой же концентрацией АК или ААК, или же ААК с АК активность фермента стимулируется более эффективно, чем при применении двойной концентрации одного из этих соединений. Полученные данные показывают, что в присутствии T_3 и фосфата из всех изученных сочетаний наиболее эффективно на активность глутаминазы действует совместное применение цитрата с каким-нибудь третьим модулятором. При этом действие как самого неэффективного (АК), так и остальных модуляторов усиливается в одинаковой степени. Из этих данных явствует, что в регуляции активности РГ не столь важна абсолютная концентрация отдельных эффекторов, сколь их удачное сочетание.

На основании полученных результатов можно прийти к выводу, что среди множества модуляторов, участвующих в регуляции активности РГ мозга, особое место занимают T_3 и фосфат. В этом процессе важное значение имеет характер взаимоотношений модуляторов, который зависит от их индивидуальных свойств и определяет место и значение каждого из них в этой сложной системе модуляторов.

Трудно сказать, какой именно из вышеописанных способов активации РГ имеет наибольшее значение, но сам факт наличия нескольких способов регуляции свидетельствует о важной роли глутаминазы в жизнедеятельности нервной клетки.

THE ROLE OF TRIIDO-L-TYRONINE IN COORDINATION OF MODULATORS OF THE SOLUBLE PHOSPHATE DEPENDENT BRAIN GLUTAMINASE

V. S. OGANESYAN, L. L. BADALYAN, and K. D. BEDZHANYAN

Institute of Biochemistry, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

The activity of soluble brain glutaminase greatly increases in the presence of triido-L-tyrosine, phosphate and a «third» modulator such as citrate, succinate, aspartate or acetyl aspartate. Any other triple combination of modulators either does not increase the enzyme activity or shows only insignificant stimulation. When four different modulators are used in combination, provided phosphate and triido-L-tyrosine are present in the medium, the efficacy of two other modulators depends on interrelations between them and every modulator plays a certain role in this complex process.

ЛИТЕРАТУРА

1. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. А. *Вопр. биохимии мозга*, т. 5, с. 5—16, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1969.
2. Оганесян В. С., Бунятыан Г. Х., Бадалян Л. А., Микиртумова К. С. *Вопр. биохимии мозга*, т. 6, с. 5—13, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
3. Svenneby G. J. *Neurochem.*, v. 18, p. 2201—2208, 1971.
4. Kvamme E., Torgner A. *Biochem. J.*, v. 149, p. 83—91, 1975.
5. Weil-Malherbe H. J. *Neurochem.*, v. 16, p. 855—864, 1969.
6. Nimmo G., Tipton K. F. *Biochem Pharmacol.*, v. 30, p. 1635—1641, 1981.
7. Nimmo G., Tipton K. F. *Eur. J. Biochem.*, v. 117, p. 57—64, 1981.
8. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г., Беджанян К. Д. *Нейрохимия*, т. 3, с. 372—381, 1984.
9. Беджанян К. Д., Бадалян Л. А., Оганесян В. С. *Нейрохимия*, т. 4, с. 379—387, 1985.
10. Бадалян Л. А., Бунятыан Г. Х., Оганесян В. С. *Вопр. биохимии мозга*, т. 10, с. 40—54, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1975.
11. Оганесян В. С., Бадалян Л. А., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. *Вопр. биохимии мозга*, т. 8, с. 77—90, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1974.
12. Палладин А. В., Кирсенко О. Б. *Биохимия*, т. 26, с. 385—390, 1961.
13. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. *Вопр. мед. химии*, т. 5, с. 538—545, 1962.
14. Lowry O. H., Rosenbrough N. T., Farr A. L., Randall R. G. *J. Biol. Chem.*, v. 193, p. 265—275, 1951.
15. Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Айрапетян Р. А., Бунятыан Г. Х. *Биол. журн. Армении*, № 33, с. 932—940, 1980.
16. Weil-Malherbe H. J. *Neurochem.*, v. 19, p. 2257—2267, 1972.

Поступила 7 VI 1988



УДК 616.895.8

ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА ФОСФОГЛИЦЕРАТМУТАЗЫ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

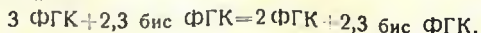
НАЗАРЯН К. Б., ЕГОРЯН Р. У., КАЗАРЯН Б. А.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

Очистка фосфоглицератмутазы (ФГМ) из головного мозга крупного рогатого скота состояла из следующих стадий: экстракции водорастворимых белков, дробного осаждения сульфатом аммония, хроматографии на карбоксиметил и ДЭАЭ-ц и сефадексе G-150. Очищенный препарат ФГМ при электрофорезе в ПААГ с ДДС-Na мигрировал в виде одной мажорной полосы величиной M_r 25 кД. ИЭТ находится в зоне pH 4.3. pH оптимум равен pH 7.0. Определены K_m данного фермента для 3-фосфоглицериновой кислоты (3 ФГК), 2,3 бис и 2-фосфоглицериновой кислоты (2 ФГК).

Проведенные исследования показали, что ФГМ головного мозга иммунологически не идентична ферменту из других тканей, что, вероятно, может свидетельствовать о ее органоспецифичности в нервной ткани.

2,3-бис фосфоглицератзависимая ФГМ (КФ 2.7.5.3)—гликолитический фермент, присутствующий во всех тканях животных и ответственный за катализ реакции:



происходящий по механизму типа «пинг-понг» [1].

Электрофоретический профиль ФГМ в различных тканях человека и животных состоит из трех димерных изоферментов MM, MB, BB [2, 3]. Во всех фетальных тканях ФГМ представлена В субъединицей и следовательно, BB изоферментом. В процессе онтогенеза в скелетных мышцах и миокарде он заменяется MM и MB изоферментами [4]. В ЦНС ФГМ представлена изоферментом с субъединичным составом BB типа. Сердечная мышца млекопитающих содержит все три формы ФГМ и поэтому служит зачастую источником их выделения [5]. Однако, если для MM и MB форм выход фермента составляет не менее 20%, то BB форма очищена с выходом 1—3%. Очевидно, что сердечная мышца не является подходящим объектом для очистки мозговой BB формы ФГМ. Более того, ФГМ головного мозга является одним из наименее изученных гликолитических ферментов и до сих пор не очищен из нервной ткани. По литературным данным, из тканей головного мозга свиньи, кошки и человека выделены лишь грубо очищенные фракции, содержащие ФГМ активность [6, 7].

Особый интерес, на наш взгляд, представляет изучение иммунологической органоспецифичности ФГМ головного мозга, поскольку такие метаболически близкие ферменты энергетического обмена, как енолаза, альдолаза и креатинкиназа в ЦНС представлены нейроспецифическими изоферментами. В этом аспекте ФГМ и ее изоферменты совершенно не изучены.

Целью настоящей работы было очистить ФГМ из головного мозга крупного рогатого скота, изучить ее основные физико-химические, каталитические и иммунологические характеристики и сравнить полученные результаты с литературными данными по изоферментам ФГМ из других тканей.

Материалы и методы

Фермент выделяли из головного мозга крупного рогатого скота. После гомогенизации ткани в 0,005 М трис- HCl pH 7,5 с 0,001 М MgCl_2 (буфере «А», соотношение ткань/буфер—1:3, вес/объем), центрифугировали 60 мин при 6000 g. К экстракту водорастворимых белков добавляли сухой сульфат аммония до 55%-ного насыщения, центрифугировали при тех же условиях и к супернатанту добавляли сульфат аммония до 70%-ного насыщения. Высаливающуюся при этом фракцию, содержащую практически всю ФГМ активность («Р-70»), использовали для дальнейшей очистки фермента, которая состояла из хроматографии на карбоксиметил-ДЭАЭ-ц (СМ-32 и ДЕ-32 «Whatman», Англия) и сефадекса G-150 («Pharmacia», Швеция).

ФГМ активность в прямой реакции определяли спектрофотометрически в сопряженной системе с енолазой по приросту поглощающего при 240 нм фосфоенолпирувата. Инкубационная среда содержала 0,08 М триэтаноламинного буфера, pH 7,6 с 0,001 М MgCl_2 , 0,01 М 3 ФГК, 0,00012 М 2,3-бис ФГК, 10 ед. енолазы и 10—100 мкг ферментного белка, объем пробы 500 мкл. Для определения активности в обратной реакции использовали сопряженную систему с 3-фосфоглицераткиназой и глицеральдегид 3-фосфатдегидрогеназой. Инкубационная среда состояла из 0,08 М триэтаноламинного буфера, pH 7,6 с 0,001 М MgCl_2 , 0,00012 М 2,3-бис ФГК, 0,03 М АТР, 0,0013 М NADH , 0,0001—0,001 М 2 ФГК, по 10 ед. 3-фосфоглицераткиназы и глицеральдегиддегидрогеназы. Скорость реакции определяли спектрофотометрически по убыли NADH при длине волны 340 нм. Белок определяли по Bradford [8], аналитический электрофорез проводили по Davis [9]. Величину M_r определяли электрофорезом в 10%-ном ПААГ с ДДС- Na и гель-фильтрацией на сефадексе G-150, а ИЭТ—фокусированием в тонком слое 5%-ного ПААГ с амфолинами диапазона pH 3,5—10 и 3,5—5 («LKB»). K_m для 3 ФГК, 2,3-бис ФГК и 2 ФГК определяли методом Лайнуивера-Берка в двойных обратных координатах [10].

Для определения pH оптимума ФГМ реакции использовали 0,05 М трис- HCl , 0,0035 М MgCl_2 pH 7,0, 8,0 и 9,0, 0,05 М трис-фосфат с 0,0035 М MgCl_2 , pH 7,0 и 8,0 и 0,05 М имидазоль- HCl , 0,0035 М MgCl_2 , pH 7,0 и 8,0 буфера.

При определении термостабильности ФГМ фермент инкубировали 15 мин при разных температурах в диапазоне 30—70° и после этого измеряли активность.

Енолазную активность в препарате очищенной ФГМ определяли по методу Baranowski, Wolna [11], 2,3-бис фосфоглицератфосфатазную — по Ramon, Jose [12], а P_i — по Tausshy и соавт. [13].

Определение иммунологической специфичности проводили, используя антисыворотку, полученную к очищенному препарату ФГМ. Для получения антисыворотки проводили иммунизацию кроликов самцов: подкожно им вводили 0,25 мл белкового раствора (1 мг/мл) с 0,25 мл полного адьюванта Фрейда. Для второй (через 8 дней) и последующих (через 14 дней) инъекций использовали то же количество белка с неполным адьювантом. Всего было проведено 5 инъекций. Кровь брали на 8-й день после последней инъекции из краевой ушной вены. Реакцию двойной иммунодиффузии проводили по Гусеву [14] в геле 1%-ного агара.

Преципитирующую способность анти-ФГМ антисыворотки тестировали следующим образом: в гомогенате головного мозга крупного рогатого скота, приготовленного на буфере 0,005 М трис-HCl, pH 7,0 с 0,001 М $MgCl_2$ определяли активность ФГМ, затем к различным количествам гомогената добавляли aliquоты антисыворотки (100 мкл), инкубировали 1 ч при 37° и оставляли на ночь при 4°, после добавления полиэтиленгликоля (M_r 6 кД) до конечной концентрации 7% оставляли 10 мин при 4° и центрифугировали 1 ч при 22000 g, затем определяли ферментативную активность в супернатанте. Вышеописанным методом определяли степень подавления активности ФГМ в гомогенатах сердца, мышц и печени крупного рогатого скота.

Результаты и обсуждение

При фракционировании на КМ-ц обессоленной диализом против буфера «А» фракции «Р-70» ФГМ активность не связывалась с матриксом колонки и полностью выходила в первом пике (рис. 1, а). Затем сконцентрированную ультрафильтрацией на фильтре РМ-10 («Diaflo», Голландия) белковую фракцию наносили на колонку с ДЭАЭ-ц (рис. 1, б) и связавшиеся белки элюировали 0—0,5 М линейным градиентом NaCl, приготовленным на буфере «А». Активность ФГМ, содержащуюся во втором пике связавшихся белков, обессоливали, сгущали и наносили на колонку с сефадексом G-150 (рис. 1, в), уравновешенную 0,01 М трис-фосфатным буфером, pH 7,5 с 0,15 М NaCl и 0,01% NaN_3 . С нее активность ФГМ выходила в объеме, соответствующем величине M_r 50 кД. На всех стадиях очистки фракции, содержащие ФГМ, элюировали в виде единственного пика, что свидетельствует об отсутствии в ткани головного мозга нескольких ее изоферментов или множественных форм. Это согласуется с литературными данными о существовании в ЦНС одного изофермента ФГМ [2—5]. Процедуру очистки иллюстрирует табл. 1, из которой видно, что фермент очищен более чем в 140 раз и У. А. конечного препарата равна 150 мкМ·мг белка⁻¹·мин⁻¹. Как очищенная ФГМ, так и препараты, полученные на различных стадиях очистки, не связываются

с сепарозой-6В-CL-цианакроновой синей-F3GA в отличие от данных Bartrons, Saggegas [5], показавших связывание всех трех изоферментов из сердечной мышцы свиньи с сепарозой-4В, конъюгированной с голубым декстраном. Подобное различие, вероятно, может объясняться как видо- или органоспецифичностью фермента, так и различиями в структуре аффинных матриц.

Таблица 1

Очистка фосфоглицератмутазы из головного мозга крупного рогатого скота

Стадия очистки	Объем (мл)	Общий белок (мг)	Общая активность (мкМ/мин)	У. А. (мкМ, мг/мин)	Выход по активности	Степень очистки
Гомогенат	1500	18000	19440	1.03	100	—
"P-70"	65	1950	10625	5.4	54.6	5
КМ-ц	100	500	8405	16.8	43.2	13.5
ДЭАЭ-ц	11	91	7250	79.6	37.3	73.7
G-150	15	32	5011	156.6	25.7	145

Величина M_r фермента, определенная электрофорезом в ПААГ с ДДС-Na, была равна 25 кД, что в сочетании со значением в 50 кД, полученным методом гель-фильтрации, свидетельствует о димерной структуре ФГМ и находится в хорошем соответствии с данными Bartrons, Carreras [5] и Hass и соавт. [15]. ИЭТ очищенного нами препарата находится при pH 4,3, что незначительно отличается от величины, полученной Bartrons, Carreras [5] для ВВ изофермента из сердца свиньи (pH 4.7).

Таблица 2

Значение K_m для ВВ изофермента фосфоглицератмутазы, выделенной нами из головного мозга и его сравнение с литературными данными для других тканей

ВВ изофермент	$K_m (M)$		
	3-фосфоглицериновая кислота	2,3-бис фосфоглицериновая кислота	2-фосфоглицериновая кислота
Головной мозг крупного рогатого скота	$2.2 \cdot 10^{-4}$ 10^{-4} [5]	$1.3 \cdot 10^{-5}$ $4 \cdot 10^{-7}$ [5]	$2.8 \cdot 10^{-4}$
Сердце свиньи	$2.7 \cdot 10^{-4}$ [1]	—	—
Почки свиньи	—	—	—
Эритроциты человека	$2.0 \cdot 10^{-4}$ [20]	—	—

При электрофорезе и изофокусировании белок мигрирует в виде одной мажорной полосы и нескольких минорных. Однако ФГМ активностью обладает только основной белковый компонент (рис. 2). pH оптимум фермента находится при значении pH 7, причем это значение не меняется при использовании имидазольного и трис-HCl буфера, он обладает довольно большой температурной устойчивостью: при 15-минутной инкубации он инактивируется на 50% при температуре 60° (рис. 3). Из литературных данных явствует, что ФГМ является бифункциональным фермен-

том, обладающим кроме основной и 2,3-бис фосфоглицерат фосфатазисй активностью [5, 16]. Как показывают наши исследования, ФГМ головного мозга также не является исключением. 2,3-бис фосфоглицерат фосфатазная активность в очищенном препарате ФГМ равна $0,0015 \text{ мкМ} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$.

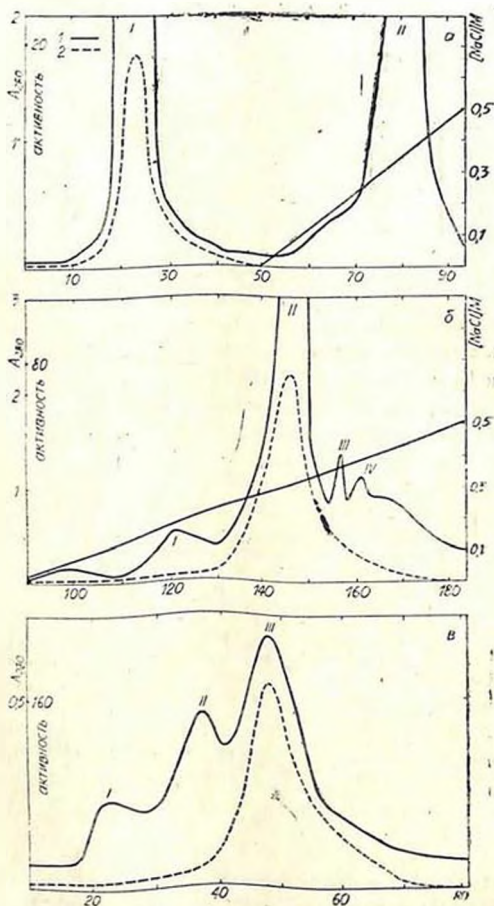


Рис. 1. Хроматографическое разделение белков фракции «Р-70» на колонках: а—с КМ-ц; б—с ДЭАЭ-ц; в—с сефадексом G-150. 1—поглощение при 280 нм, 2—фосфоглицератмутанная активность. По оси абсцисс—номера фракции. По оси ординат слева—поглощение при 280 нм и фосфоглицератмутанная активность в мкМ/мин/мг , справа—концентрация NaCl

Из других сопутствующих ферментативных активностей нас интересовало наличие в препарате метаболически близкой енолазной активности. Оказалось, что препарат ФГМ содержит также около 0,01% енолазной активности, но она целиком связана с одним из минорных компонентов в препарате, о котором упоминалось выше.

Значение K_m для субстратов ФГМ в прямой и обратной реакции не отличаются существенно от таковых для ферментов, выделенных из других источников, в то время как K_m для 2,3 бис ФГК на два порядка выше, чем для фермента, выделенного из сердца свиньи (табл. 2).

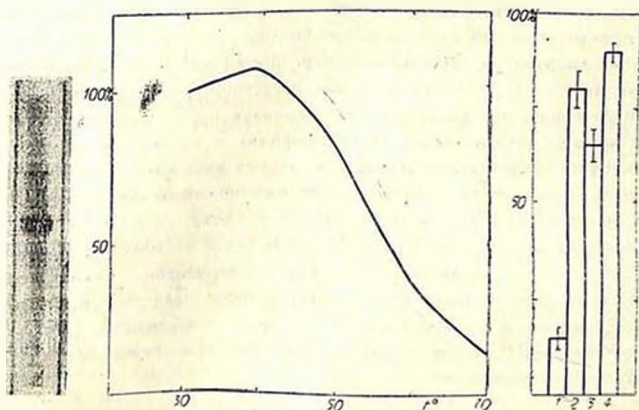


Рис. 2. Электрофореграмма очищенного белка в ПААГ в денатурирующих условиях

Рис. 3. Влияние температуры на активность фосфолициратмутазы. По оси ординат—ферментативная активность в %, по оси абсцисс—температура

Рис. 4. Подавление активности фосфолициратмутазы специфической антисывороткой в экстрактах следующих тканей крупного рогатого скота: 1—мозг, 2—скелетная мышца, 3—сердце, 4—печень. По оси ординат—ферментативная активность в %

Изучение инактивирующего действия *n*-хлормеркурий бензоата выявило большую устойчивость ВВ изофермента по сравнению с ММ и МВ изоферментами, что соответствует литературным данным [3]. Таким образом, сопоставление полученных в настоящей работе результатов по изучению основных физико-химических и каталитических свойств ВВ изофермента ФГМ из нервной ткани крупного рогатого скота с результатами ряда авторов [3—5] не выявили существенных различий.

При иммунологическом исследовании преципитирующей способности антисыворотки к очищенному препарату ВВ изофермента ФГМ головного мозга было обнаружено следующее. Ранее нами было показано, что эта антисыворотка имеет значительно более низкий титр при тестировании ее с экстрактами печени, сердца, мышц и семенников крупного рога-

того скота [17]. Поэтому в настоящей работе была протестирована ее преципитирующая способность на ФГМ активность в экстрактах различных тканей. Антисыворотка к ФГМ преципитирует из экстракта белков головного мозга около 85% активности. Из белкового же экстракта печени, скелетных мышц и сердца преципитирует 20, 30 и 10% соответственно (рис. 4). Это свидетельствует об иммунологической неидентичности ФГМ головного мозга ферменту из других тканей, что, вероятно, может быть обусловлено органоспецифичностью ФГМ в нервной ткани. Если ВВ изофермент ФГМ головного мозга обладает определенной органоспецифичностью, то можно утверждать, что гликолиз в ЦНС на отрезке метаболизма триозофосфатов, а точнее в последовательности превращений: 3-фосфоглицериновая кислота → 2-фосфоглицериновая кислота → фосфоенопируват → пируват в значительной мере обеспечен органоспецифическими изоферментами. Действительно, как известно, γγ изофермент енолазы — нейроспецифическая енолаза, локализованная практически исключительно в нейронах, иммунологически специфична и отличается по некоторым функциональным характеристикам от других изоферментов [19]. М₂ изофермент пируваткиназы также имеет иммунологические и функциональные различия от М₁ и L изоферментов, а также отличается от М₂ изофермента из других тканей [19]. Наличие такой метаболически последовательной триады органоспецифических изоферментов, весьма вероятно, имеет свое функциональное значение, которое предстоит выяснить. Это может привести к формированию представлений об особой специализации гликолиза в ЦНС либо на стадии метаболизма триозофосфатов, либо всего метаболического пути в целом.

PURIFICATION AND CHARACTERISTICS OF PHOSPHOGLYCEROMUTASE FROM CATTLE BRAIN

K. B. NAZARYAN, R. U. EGORYAN, and B. A. KAZARYAN

Institute of Experimental Biology, Academy of Sciences of the Armenian SSR, Yerevan

Purification of phosphoglyceromutase (PGM) from cattle brain consists of the following steps: extraction of water soluble proteins, fractional precipitation by ammonium sulfate, chromatography on carboxymethyl and DEAE-celluloses and G-150 Sephadex. The purified PGM preparation, when electrophoresed in SDS—PAAG, migrated as a single major band having M_r of 25 kD and IEP in the region of pH 4.3. The pH optimum of the enzyme was 7.0. We determined K_m of this enzyme for phosphoglyceric acid (3-PGA), 3-diphosphoglyceric acid (2,3-bis-PGA) and 2-phosphoglyceric acid (2-PGA). Brain PGM immunologically is non-identical to the enzyme from other tissues suggesting that PGM of the nerve tissue may be an organ-specific enzyme.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Grisolia S., Carreras J.* Meth. in Enzymology, N. Y., Acad. Press, v. 42, p. 435—437, 1975.
2. *Mezquita J., Carreras J.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 70B, p. 237—245, 1981.
3. *Carreras J., Boach J., Mezquita J.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 71B, p. 57—63, 1982.
4. *Mezquita J., Bartrons R., Pons G., Carreras J.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 70B, p. 247—255, 1981.
5. *Bartrons R., Carreras J.* Biochem. et biophys. acta, v. 708, p. 167—177, 1982.
6. *Carreras J., Bartrons R., Rosch J., Pons G.* Comp. Biochem. and Physiol., v. 70B, p. 477—485, 1981.
7. *Pons G., Berrocal F., Tauler A., Carreras J.* Comp. and Biochem. Physiol., v. 80B, № 3, p. 551—556, 1985.
8. *Bradford M. E.* Anal Biochem., v. 72, p. 248—254, 1976.
9. *Davis B. J.* Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 121, p. 404—427, 1964.
10. *Дуксон М., Уэбб Э.* Ферменты, М., Мир, 1982.
11. *Baranovski T., Wolna E.* Meth. in Enzymology, N. Y., Acad. Press, v. 42, p. 335—338, 1975.
12. *Ramon B., Jose C.* Biochem. et biophys. acta., v. 708, p. 167—177, 1982.
13. *Tausshy E., Shorr H. H.* J. Biol. Chem., v. 202, p. 675, 1953.
14. *Гусев А. И.*—В кн.: Имунохимический анализ. (под ред. Л. А. Зильбера), с. 99—119, М., Медицина, 1968.
15. *Huss L. F., Sheibley R. H., Kappel W. K., Miller K. B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 72, № 3, p. 976—983, 1976.
16. *Rose Z. B.* Adv. Enzyme, v. 51, p. 211—253, 1980.
17. *Назарян К. Б., Егорян Р. У., Казарян Б. А.* II Республиканская конференция, посвященная проблемам физико-химической биологии, с. 69, Ереван, 1986.
18. *Назарян К. Б., Казарян Б. А., Карапетян Н. Г.* Укр. биохим. журн. т. 58(4), с. 72—76, 1986.
19. *Willis-Totle S., Dyson R. D., Newburgh R. W., Gardenus J. M.* J. Neurochem v. 27, p. 1355—1366, 1976.
20. *Huss L. F., Miller K. B.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 95, N. 1, p. 132—139, 1980.

Поступила 17. IV 1989



УДК 591.484+617.735—002.156+577.153

ИЗМЕНЕНИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПРИ НАСЛЕДСТВЕННОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ СЕТЧАТКИ

ЕФИМОВА М. Г., ОСТАПЕНКО И. А., БРАЙЛОВСКАЯ И. В., ЭТИНГОФ Р. Н.

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

У крыс с наследственной дегенерацией сетчатки увеличение индуцируемости ПОЛ в присутствии железа и аскорбата по сравнению со здоровыми животными имеет место в трех тканях: мозгу, сетчатке и пигментном эпителии глаза и не отмечено в печени и легких. Увеличение индуцируемости ПОЛ в тканях больных животных проявляется только в первый месяц постнатальной жизни. Не отмечено различия в активности антиокислительных ферментов: супероксиддисмутазы (в сетчатке), глутатионпероксидазы и глутатионредуктазы (в сетчатке и в мозгу), ксантиноксидазы (в мозгу) больных и здоровых крыс в ранние периоды постнатальной жизни. Установлено, что выявлено: ранее уменьшение содержания продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой в мозгу и сетчатке больных крыс зависело от способа обработки тканей перед анализом (щелочной гидролиз, кислотный гидролиз, реакция с тиобарбитуровой кислотой до гидролиза). В ткани мозга различия между здоровыми и больными животными обнаруживали только в том случае, если препараты не подвергали гидролизу; в случае сетчатки различия выявляли и после применения кислотного гидролиза тканей.

Ранее нами были выявлены своеобразные изменения ПОЛ в мозгу и сетчатке крыс при наследственной дегенерации этой ткани. Было показано, что на ранних стадиях болезни в изученных тканях больных животных в отличие от здоровых имела место диспропорция в содержании начальных, промежуточных и конечных продуктов эндогенного ПОЛ [1], которая выражалась в том, что у больных крыс при увеличении содержания диеновых конъюгатов и шиффовых оснований (сетчатка) или при их неизменном содержании (мозг) количество промежуточных продуктов ПОЛ, выявляемых при помощи теста с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК), так называемых ТБК-активных продуктов (ТБАП), оказалось уменьшенным. Обычно считают, что эти продукты соответствуют малоновому диальдегиду (МДА).

Чтобы выяснить, с чем связано уменьшение содержания ТБАП в сетчатке и мозгу больных животных, в настоящей работе нами были изучены активности некоторых антиокислительных ферментов, регулирующих процессы образования и утилизации МДА, в частности, в ткани

мозга и сетчатки—активность двух форм глутатионпероксидазы (ГП, КФ 1.11.1.9, Se-зависимой и общей) которая восстанавливает гидроперекиси полиненасыщенных жирных кислот, входящих в состав мембранных липидов, препятствуя образованию из них МДА; и в ткани мозга активность ксантиноксидазы (КСО) КФ 1.2.3.2—фермента, окисляющего различные альдегиды, в том числе и МДА. Для более полной характеристики системы эндогенного ПОЛ у крыс с наследственной дегенерацией сетчатки нами были исследованы активности и других ферментов антиокислительной защиты: в сетчатке—активность супероксиддисмутазы (СОД), КФ 1.15.1.1; в сетчатке и мозгу—активность глутатионредуктазы (ГР), КФ 1.6.4.1.

Следует, однако, отметить, что небольшое содержание ТБКАП в исследованных тканях больных животных было ранее выявлено методом Стальной, Гаришвили [2], с помощью которого оценивают, по-видимому, лишь свободную форму ТБКАП, так как реакцию с ТБК проводят в супернатанте после осаждения белков. Необходимо указать, что существует много методов определения МДА (ТБКАП), отличающихся способами обработки тканей [3, 4]. Кроме того, относительно недавно установлено наличие в тканях, в частности печени, значительных количеств связанной формы МДА, которая обнаруживается лишь после щелочного гидролиза препаратов [5]. Учитывая эти данные, мы сравнивали различные методы определения ТБКАП, а именно: метод, которым мы пользовались ранее [2]; широко применяемый метод [6], включающий в себя кислый гидролиз препаратов и метод, в котором используют щелочной гидролиз [5].

В предыдущей работе [1] было отмечено также, что на ранних этапах заболевания индукция ПОЛ системой железо+аскорбат в сетчатке и мозгу больных животных значительно выше, чем у здоровых. Продолжая эту линию исследований, в настоящей работе выясняли вопрос, в какой мере этот феномен специфичен для тканей мозга и сетчатки или он обнаруживается и в других тканях, а также в какие сроки болезни изменения индуцированного ПОЛ наиболее очевидны.

Материалы и методы

В работе использовали крыс-самцов линии *Campbell* с наследственной дегенерацией сетчатки и здоровых крыс линии *Wistar* в возрасте от 2 до 40 дней. Основная часть работы выполнена на гомогенатах тканей больших полушарий мозга, часть опытов—на сером и белом веществе мозга, сетчатке, пигментном эпителии глаза, печени и легких. Печень и легкие предварительно перфузировали 0,9%-ным раствором NaCl.

МДА (ТБКАП) определяли спектрофотометрически по поглощению продукта его взаимодействия с ТБК при длине волны 532 нм. Свободную форму ТБКАП выявляли методом [2], при котором супернатант, полученный после осаждения белков исследуемой ткани, кипятят с раствором ТБК. При использовании метода Buege, Aust (кислый гидролиз) [6] гомогенат ткани кипятили в кислой среде, содержащей ТБК. Щелочной гидролиз гомогената проводили при pH 13, температуре 60° в течение

30 мин по методу Lee, Csallany [5], после чего гидролизат обрабатывали методом Стальной, Гаришвили [2]. При определении ТБКАП в белковой и липидной фракциях липиды извлекали методом Folch [7], белковые и липидные экстракты упаривали, после чего в этих фракциях ранее указанными методами, [2] и [5] определяли ТБКАП. При определении ТБКАП в среду гомогенизации и в экстрагирующие смеси добавляли ионол из расчета 1 мг на 100 мл для предотвращения накопления МДА за время проведения анализа. Содержание МДА (ТБКАП) выражали в нмоль/мг белка в случае гомогенатов и белковой фракции и в нмоль/мг липидного фосфора в случае липидной фракции. Белок определяли модифицированным методом Lowry [8], липидный фосфор—методом Васковского [9].

Скорость индуцированного ПОЛ оценивали по накоплению МДА, который выявляли методом Buege, Aust [6]. В опытах по индукции ПОЛ для каждой ткани предварительно подбирали такие условия, чтобы процесс накопления МДА носил прямолинейный характер в зависимости от времени инкубации. Индукцию ПОЛ системой железо+аскорбат осуществляли так же, как и ранее [1]. NADPH-зависимую индукцию ПОЛ проводили при 37° с использованием 0,5 мМ NADPH; индукцию останавливали добавлением ионола в указанной выше концентрации. В опытах по изучению влияния ЭДТА и ЭДТА+Ca²⁺ на процесс индуцированного ПОЛ, индукцию ПОЛ системой железо+аскорбат проводили в гомогенатах мозга, содержащих различные концентрации ЭДТА и ЭДТА+CaCl₂ (соотношение между концентрациями ЭДТА и CaCl₂—0,1 и 0,15 мМ соответственно).

Активности ГП и ГР определяли по методу Hosoda, Nakamura [10]. В случае ГП инкубационная смесь содержала 0,05 М фосфатный буфер pH 7,4, 10⁻³ М ЭДТА, 5·10⁻³ М NADPH, 5·10⁻⁴ М восстановленного глутатиона, 0,5 ед. глутатионредуктазы из дрожжей («Sigma», США), 2·10⁻¹ М гидроперекиси кумола (для выявления полной глутатионпероксидазной активности) или 2·10⁻⁴ М перекиси водорода (для выявления Se-зависимой формы фермента) и исследуемую пробу. В случае ГР инкубационная смесь содержала 0,05 М фосфатный буфер pH 7,4, 10⁻³ М ЭДТА, 5·10⁻⁵ М NADPH, 5·10⁻⁴ М окисленного глутатиона и исследуемую пробу. В обоих случаях реакцию регистрировали спектрофотометрически по убыли NADPH при длине волны 340 нм. Активность ферментов выражали в нмоль окисленного или восстановленного глутатиона для ГП и ГР соответственно за 1 мин и нормировали на мг белка исследуемой пробы.

Активность КСО определяли по методу Kela [11] при температуре 30°. Инкубационная смесь содержала 0,05 М фосфатный буфер, pH 7,4, 30 мкМ гипоксантина и исследуемую пробу. Реакцию регистрировали спектрофотометрически по накоплению мочевой кислоты при длине волны 292 нм. Активность КСО выражали в нмоль образовавшейся мочевой кислоты за 1 мин и нормировали на мг белка исследуемой пробы.

Активность Cu, Zn-СОД определяли полярографическим методом с

использованием ртутного капельного электрода [12]. Концентрацию СОД сетчатки рассчитывали в мг фермента на г белка исследуемой пробы, принимая молекулярный вес СОД сетчатки равным величине M_r фермента эритроцитов—32000 [13].

Результаты и обсуждение

В табл. 1 суммированы результаты опытов по содержанию ТБКАП, определенных разными способами в различных тканях здоровых и больных крыс. Из приведенных данных очевидно, что при определении ТБКАП методом, которым мы пользовались ранее [2], выявлены значительные различия в тканях сетчатки и мозга больных крыс по сравнению со здоровыми. Поскольку этот феномен не мог быть объяснен изменением активности ферментов антиокислительной защиты, влияющих на образование и утилизацию МДА, а именно, ГП в сетчатке и мозгу и

Таблица 1

Содержание ТБКАП в гомогенатах различных тканей крыс
линии Wistar и Campbell

Ткань	Возраст животных (дни)	Метод определения ТБКАП	Содержание ТБКАП $\mu\text{моль/мг}$ белка	
			Wistar	Campbell
Сетчатка	20	[2]	$0,167 \pm 0,015^*$ (n=5)	$0,089 \pm 0,011$ (n=5)
	40	[2]	$0,43 \pm 0,08^*$ (n=5)	$0,26 \pm 0,05$ (n=5)
		[6]	$0,33 \pm 0,02^*$ (n=6)	$0,20 \pm 0,01$ (n=5)
Мозг	2—5	[2]	$0,129 \pm 0,019^*$ (n=8)	$0,045 \pm 0,05$ (n=8)
		[6]	$0,31 \pm 0,03$ (n=6)	$0,26 \pm 0,02$ (n=6)
		[5]	$0,13 \pm 0,02$ (n=6)	$0,13 \pm 0,03$ (n=6)
	20	[2]	$0,184 \pm 0,013^*$ (n=6)	$0,059 \pm 0,005$ (n=6)
		[6]	$0,39 \pm 0,05$ (n=18)	$0,38 \pm 0,05$ (n=21)
	40	[2]	$0,206 \pm 0,028^*$ (n=6)	$0,077 \pm 0,011$ (n=6)
		[6]	$0,27 \pm 0,01$ (n=12)	$0,24 \pm 0,02$ (n=12)
	20	[2]	$0,032 \pm 0,003$ (n=16)	$0,035 \pm 0,003$ (n=14)
Печень		[6]	$0,28 \pm 0,03$ (n=12)	$0,24 \pm 0,01$ (n=12)
	20	[6]	$0,35 \pm 0,03$ (n=7)	$0,35 \pm 0,04$ (n=8)
Легкие	20	[6]		

Примечание. Здесь и в табл. 3 *различия между крысами линии Wistar и Campbell достоверны при $p < 0,05$. n—число животных в опыте.

КСО в мозгу (при этом не менялась также активность СОД и ГР, табл. 2), необходим был дополнительный анализ полученных результатов. При этом было выяснено, что уменьшение содержания ТБКАП в тканях больных животных по сравнению со здоровыми существенно зависело от метода, использованного для определения этих продуктов (табл. 1). В этом отношении ткани можно было условно разбить на три группы: а) в ткани сетчатки эта разница выявлялась при использовании методов Стальной, Гарншвили [2] и Buege, Aust [6] и составляла 40—50% у больных крыс по сравнению со здоровыми; б) в ткани мозга различия

Таблица 2

Активность антиокислительных ферментов в сетчатке и мозгу крыс линии Wistar и Campbell

Фермент	Ткани	Возраст животных (дни)	Активность фермента		Единицы измерения активности
			Wistar	Campbell	
СОД	сетчатка	25—30	$0,44 \pm 0,02$ (n=12)	$0,45 \pm 0,02$ (n=14)	мг фермента/г белка
КСО	мозг	20	$0,14 \pm 0,01$ (n=16)	$0,12 \pm 0,01$ (n=15)	нмоль мочевой кислоты/мг белка·мин
		40	$0,08 \pm 0,006$ (n=15)	$0,093 \pm 0,004$ (n=14)	
ГР	сетчатка	20	$20,9 \pm 0,9$ (n=6)	$23,6 \pm 0,9$ (n=6)	нмоль восстановленного глутатиона/мг белка·мин
	мозг	20	$16,6 \pm 0,5$ (n=6)	$18,3 \pm 0,7$ (n=6)	
ГП по отношению к гидроперекиси купола	сетчатка	20	$35,9 \pm 0,4$ (n=5)	$36,2 \pm 0,6$ (n=5)	нмоль окисленного глутатиона/мг белка·мин
	мозг	20	$17,4 \pm 0,1$ (n=5)	$17,3 \pm 0,6$ (n=5)	
по отношению к перекиси водорода	сетчатка	20	$22,5 \pm 0,2$ (n=6)	$19,9 \pm 0,6$ (n=6)	
	мозг	20	$9,3 \pm 0,2$ (n=6)	$10,1 \pm 0,4$ (n=6)	

Примечание. n—число животных в опыте.

могли быть выявлены лишь при использовании метода [2], при помощи которого оценивают, по-видимому, свободную форму ТБКАП (при кислотном гидролизе наблюдалась только тенденция к снижению уровня ТБКАП в мозгу больных крыс по сравнению со здоровыми); в) в ткани печени ни один из примененных способов определения ТБКАП не позволял выявить уменьшения этих продуктов у больных крыс.

Полученные в этой серии экспериментов факты позволили заключить, что уменьшение содержания ТБКАП в тканях сетчатки и мозга больных животных проявляется в том случае, если препараты не под-

пергаались ни кислотному, ни щелочному гидролизу. Однако после кислотного гидролиза разница в количестве ТБКАП у больных и здоровых крыс уменьшалась в случае сетчатки и исчезала в случае мозга. Это, вероятно, свидетельствует о том, что ткани мозга больных и здоровых животных отличаются по содержанию свободной формы МДА (ТБКАП), а ткани сетчатки—по содержанию и свободной, и связанной форм этого продукта ПОЛ. Для выяснения вопроса с какими компонентами ткани могли бы быть связаны ТБКАП, было проведено их определение отдельно в белковой и липидной фракциях ткани мозга после щелочного гидролиза этих фракций, в результате которого освобождается вся связанная форма ТБКАП [5]. Изменений в содержании ТБКАП в липидной фракции не отмечали (рис. 1, а). В то же время в белковой фракции мозга после ще-

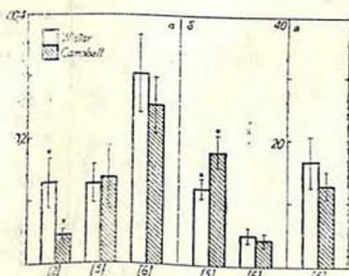


Рис. 1. Содержание ТБКАП в гомогенатах (а), белковых (б) и липидных (в) фракциях мозга 2—5-дневных крыс линии Wistar и Campbell. По оси абсцисс—различные методы определения ТБКАП, по оси ординат—содержание ТБКАП: для а, б—в имоль/мг белка, для в—в имоль/мг липидного фосфора; *различия достоверны при $p < 0,05$.

лочного гидролиза содержание ТБКАП у больных и здоровых крыс увеличивалось неодинаково: у больных животных степень увеличения этих продуктов была достоверно больше, чем у здоровых (рис. 1, б). Эти данные дают основание считать, что снижение содержания так называемой свободной формы ТБКАП в мозгу больных крыс обусловлено тем, что определенная доля этих продуктов находится в связанном с белками состоянии. Вопросы о характере этой связи, природе связывающих белков пока не ясны.

Кроме изменений в содержании ТБКАП, ранее нами было показано [1], что индукция ПОЛ системой железо+аскорбат в сетчатке и мозгу больных крыс на ранних этапах заболевания существенно выше, чем у здоровых. Продолжая эту линию исследований, в настоящей работе было установлено, что этот феномен имеет также выраженный тканеспецифичный характер и проявляется, помимо сетчатки и мозга, в пигментном эпителии больных крыс. В печени и легких этого феномена не отмечено (табл. 1). Индукция ПОЛ в мозгу больных животных была выше и в

тем случае, если в качестве индуктора применяли NADPH. При индукции ПОЛ системой железо+аскорбат отдельно в сером и белом веществе мозга было установлено, что увеличение индукции характерно именно для серого вещества, в то время как накопление МДА в белом веществе в ходе индукции ПОЛ одинаково у больных и здоровых крыс (табл. 3).

Таблица 3

Индукция ПОЛ системой железо+аскорбат и NADPH-зависимой системой в гомогенатах различных тканей крыс линии Wistar и Campbell

Индуктор	Ткань	Возраст животных (дни)	Накопление МДА нмоль/мг белка		Время индукции (мин)
			Wistar	Campbell	
NADPH	мозг	5	0.67±0.05* (n=6)	0.98±0.07 (n=6)	12
		10	0.81±0.05* (n=6)	2.31±0.09 (n=6)	12
Железо+аскорбат	мозг	5	0.20±0.03* (n=6)	0.50±0.10 (n=6)	6
		20	2.22±0.21* (n=6)	3.31±0.27 (n=6)	6
	серое вещество мозга	20	5.17±0.64* (n=6)	7.29±0.31 (n=5)	6
	белое вещество мозга	20	4.05±0.69 (n=6)	4.16±0.1 (n=6)	6
	мозг	40	9.19±1.03 (n=6)	8.47±0.42 (n=5)	6
		20	3.17±0.41* (n=5)	9.26±1.48 (n=6)	6
	сетчатка	40	11.34±1.57* (n=6)	6.30±0.91 (n=6)	6
		20	2.18±0.18* (n=7)	3.55±0.63 (n=7)	6
	пигментный эпителий глаза	40	1.61±0.16 (n=8)	1.45±0.22 (n=8)	6
		20	1.48±0.15 (n=15)	1.62±0.14 (n=15)	3
	печень	20	2.14±0.37 (n=7)	1.72±0.16 (n=7)	3

Примечание. *различия между крысами линии Wistar и Campbell достоверны при $p < 0.05$. n—число животных в опыте.

В отличие от ранее отмеченного феномена снижения содержания ТБКАП в мозгу и сетчатке крыс с наследственной дегенерацией по сравнению со здоровыми, увеличение индукции ПОЛ в тканях больных крыс оказалось строго ограниченным периодом постнатальной жизни: к 40-ую жизни, то есть в период выраженной патологии, во всех тканях (сетчатка, мозг, пигментный эпителий), разница в индукции ПОЛ не выявлялась. Итак, по тканеспецифичности феномены снижения содержания ТБКАП и увеличения индукции ПОЛ в сетчатке и мозгу больных животных подобны.

Чем же можно объяснить увеличение индукции ПОЛ в пигментном эпителии, сетчатке и мозгу больных крыс в ранний период постнатального онтогенеза, какие изменения мембран могли бы быть ответственны за наблюдаемый феномен? Согласно имеющимся в настоящее время представлениям, одним из факторов, определяющих инициацию, развитие и интенсивность процесса ПОЛ, является ион железа [14]. Последний может быть и про-, и антиоксидантом; эффект иона определяется соотношением его окисленной и восстановленной форм, связью с отдельными компонентами и т. д. [15, 16]. Иногда для изучения роли иона железа в процессах ПОЛ используют косвенный подход, в частности, применяют хелатор двухвалентных ионов—ЭДТА, добавляя при этом в смесь Ca^{2+} для предотвращения деструкции мембран за счет связывания ЭДТА эндогенного Ca^{2+} и других двухвалентных катионов [17].

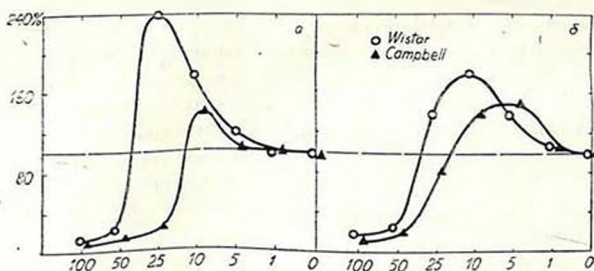


Рис. 2. Влияние различных концентраций ЭДТА (а) и ЭДТА+ Ca^{2+} (б) на индукцию ПОЛ системой железо+аскорбат в гомогенатах мозга 20-дневных крыс линий Wistar и Campbell. По оси абсцисс—концентрация ЭДТА (соотношение между концентрациями ЭДТА и Ca^{2+} см. в «Материалах и методах»), по оси ординат—накопление МДА (в %) в ходе индукции ПОЛ при различных концентрациях ЭДТА или ЭДТА+ Ca^{2+} в инкубационной смеси по отношению к МДА, образовавшемуся при индукции ПОЛ без добавления ЭДТА или ЭДТА+ Ca^{2+} .

При изучении нами влияния разных концентраций ЭДТА (в присутствии Ca^{2+} и без него) на процесс ПОЛ, индуцированный системой железо+аскорбат в ткани мозга больных и здоровых крыс 20-дневного возраста, была выявлена различная реактивность процесса ПОЛ у этих групп животных. У больных и здоровых крыс низкие концентрации ЭДТА обуславливали прооксидантный эффект, однако концентрации ЭДТА, необходимые для максимально выраженного прооксидантного действия, оказались для препаратов мозга больных крыс явно ниже, чем у здоровых (концентрация белка в пробах была одинаковой). Так, например, для здоровых крыс эта концентрация составляла 25 мкМ, для больных—10 мкМ. В опытах другой серии—10 и 5 мкМ соответственно (рис. 2, а, б). Различия были отмечены и в степени выраженности прооксидантного эффекта, например, 140% для здоровых крыс и только 40% для больных (рис. 2, а).

Обсуждая эти результаты, следует иметь в виду, что используемый нами способ исследования этого феномена может дать лишь сугубо ориентировочные представления о роли железа в этом процессе, поскольку эффекты ЭДТА на мембрану и процесс ПОЛ весьма разнообразны, зависят от соотношения хелатор-ион железа, причем сам по себе образующийся комплекс не инертен [18]. Однако так или иначе выявление разной реактивности мембран мозга к ЭДТА у больных и здоровых животных открывает дополнительные перспективы: для анализа ранних нарушений мембран при наследственной дегенерации сетчатки.

В целом резюмируя полученные результаты, можно констатировать, что наиболее ранние изменения отдельных компонентов мембран при наследственной дегенерации сетчатки проявляются в трех тканях: мозгу, сетчатке и пигментном эпителии глаза. В этих тканях у больных животных резко увеличен по сравнению со здоровыми процесс индукции ПОЛ системой железо+аскорбат. Кроме того, уже на 2—5-й день постнатального онтогенеза в ткани мозга больных крыс по сравнению со здоровыми имеет место, по-видимому, изменение содержания разных форм ТБКАП (свободная, связанная). Выявлена также разная реактивность мембран мозга больных и здоровых крыс к ЭДТА. Выяснение вопросов о природе связанного компонента (МДА?), о белках (-е), связывающих этот компонент у больных крыс и о причине разной реактивности мембран мозга больных и здоровых животных к ЭДТА является предметом дальнейших исследований.

CHANGES OF LIPID PEROXIDATION DURING HEREDITARY RETINAL DEGENERATION

M. G. EFIMOVA, I. A. OSTARENKO, I. V. BRAILOVSKAYA,
and R. N. ETINGOF

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

Campbell rats with hereditary retinal degeneration have increased (as compared with normal Wistar rats) lipid peroxidation in presence of Fe^{2+} and ascorbic acid in three tissues (retina, retinal pigment epithelium and brain) during the first month of postnatal life. In the liver and lungs of both rat strains the induced lipid peroxidation is similar. The quantity of the material which reacts with thiobarbituric acid depends on the method used for tissue pretreatment before the assay. The activity of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and xanthine oxidase in retina and brain are similar in Campbell and Wistar rats during early postnatal life.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ефимова М. Г., Остареико И. А., Этингоф Р. Н. Нейрохимия, т. 6, с. 406—412. 1987.

2. Стельная Н. Д., Гершивили Т. Г.—В кн.: Современные методы в биохимии, с. 68—70. М. Медицина 1977.
3. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Anal. Biochem., v. 5, p. 351—358, 1979.
4. Uchiyama M., Mihara M. Anal. Biochem., v. 86, p. 271—278, 1978.
5. Lee H.-S., Csallany A. S. Lipids, v. 22, p. 104—107, 1987.
6. Buege J. A., Aust S. D. Methods in Enzymology, v. 52, p. 302—310, 1978.
7. Folch J., Lees M., Stanley G. H. J. Biol. Chem., v. 226, p. 497—509, 1957.
8. Murwell M. A. K., Haas S. H., Betler L. L., Tolbert N. E. Anal. Biochem., v. 87, p. 205—210, 1978.
9. Препаративная биохимия липидов (под ред. А. Д. Бергельсона), М., Наука, 1981.
10. Hosoda S., Nakamura W. Biochim. et biophys. acta, v. 222, p. 53—64, 1970.
11. Kela U., Vijayvargiya R., Trivedi C. P. Life Sci., v. 27, p. 2109—2119, 1980.
12. Rigo A., Rotilio G. Anal. Biochem., v. 81, p. 157—166, 1977.
13. Benstager R. E., Crabb J. W., Johnson C. M. Exp. Eye Res., v. 34, p. 623—634, 1982.
14. Владимиров Ю. А., Арчаков А. Н. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах, М., Наука, 1972.
15. Minotti G., Aust S. D. J. Biol. Chem., v. 262, p. 1058—1114, 1987.
16. Келен В. Е., Орлов О. Н., Прилишко Л. А. Проблема анализа эндогенных продуктов перекисного окисления липидов. Биофизика (Итоги науки и техники ВИНИТИ АН СССР), т. 18, 1986.
17. Stone W. L., Farnsworth C. C., Deate E. A. Exp. Eye Res., v. 23, p. 387—397 1979.
18. Tien M., Morenhause L. A., Eucher J. R., Aust S. D. Arch. Biochem. Biophys., v. 218, p. 450—458, 1982.
19. Эттингер Р. Н., Остапенко Н. А., Чусова Г. Г.—В кн.: Физиологические науки и медицина, с. 67—76, Л., Наука, 1983.

Поступила 12. IV 1988



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.821.7+612.82+577.1

МЕТАБОЛИЗМ СЕРТОНИНА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ
КРЫС ПРИ ЛИШЕНИИ ИХ ПАРАДОКСАЛЬНОЙ
ФАЗЫ СНА

МАЛИКОВ У. М., ДЕМИН Н. Н.

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

Согласно Jouvet [1] и ряду других исследователей, серотонин принимает непосредственное участие в процессах сна. В частности, показано [2], что метаболизм серотонина в головном мозгу во время медленноволновой фазы сна усиливается, снижаясь при наступлении парадоксальной фазы сна (ПФС). Торможение же активности катаболизирующей серотонин МАО типа А путем введения специфического ингибитора приводило к значительному уменьшению доли ПФС в цикле сна [3]. Несмотря на многочисленные исследования, конкретная функция серотонина в динамике сна остается пока неясной. В связи с этим важно и детальное изучение метаболизма серотонина в головном мозгу при сне и его нарушениях. На путях дальнейшего изучения метаболизма серотонина в этих условиях казалось желательным исследовать влияние избирательного лишения ПФС на содержание и катаболизм серотонина именно в серотонинергических структурах головного мозга.

Опыты были проведены на крысах-самцах линии *Wistar*, массой 140—180 г. Избирательное лишение ПФС осуществляли по методу Jouvet и соавт. [4], помещая животных на деревянные площадки (размером 45×45 мм) над водой. В этих условиях у крыс может развиваться медленноволновая фаза сна, но они лишены возможности свободно лежать, что необходимо для развития ПФС. При этом они испытывают определенную гипокинезию, однако выраженных явлений стресса при 1—2-суточном опыте у них не проявляется, что позволяет полагать о возможности использования данного метода для моделирования состояния именно лишения ПФС [5]. Вообще же факт ненормально длительного выпадения ПФС в естественных циклах бодрствование—сон сам по себе является, несомненно, стрессорным, чем бы он ни был вызван.

Через 24 ч лишения ПФС крыс сразу декапитировали. Из головного мозга выделяли средний и промежуточный мозг. В 10%-ных гомоген-

натах определяли содержание серотонина и продукта его катаболизма—5-оксинидоуксусной кислоты (5-ОИУК) спектрофлуорометрическим методом [6]. Для точного совпадения спектров возбуждения и флуоресценции серотонина, экстрагированного из ткани, со спектрами серотонина—стандарта, гомогенизацию ткани проводили в 0,1 н. HCl, насыщенной NaCl, а не в бутаноле [7]. Флуоресценцию проб измеряли на спектрофотометре фирмы «Hitachi» (Япония) при следующих длинах волн: возбуждения—360 нм и флуоресценции—480 нм. Содержание серотонина и 5-ОИУК рассчитывали в микрограммах на 1 г влажной ткани. В качестве стандарта использовали растворы серотонина («Reanal», Венгрия) и 5-ОИУК («Sigma», США). Для определения активности MAO выделяли целиком стволовую часть головного мозга. Ткань, полученную от 2 животных, объединяли и гомогенизировали в гомогенизаторе тефлон-стекло в следующей среде: 0,32 М сахарозе, 10 мМ трис-HCl и 1 мМ ЭДТА, pH 7,4. Методом градиентного центрифугирования получали очищенные митохондриальную и синаптическую фракции. Осадки этих фракций суспендировали в 0,01 М фосфатном буфере (pH 7,4) и использовали для определения активности MAO по методу Горкина и соавт. [8]. Инкубацию каждой субцеллюлярной фракции проводили в присутствии 1 мМ серо-

Таблица

Содержание серотонина и 5-оксинидоуксусной кислоты (в мкг/г сырой массы) в среднем и промежуточном мозгу крыс при лишении парадоксальной фазы сна (ПФС)		
Состояние животного	Средний мозг	Промежуточный мозг
С е р о т о н и н		
Бодрствование	1,170±0,047 (12)	1,330±0,044 (15)
Лишение ПФС	1,290±0,045 (12)	1,470±0,052 (16)
5-оксинидоуксусная кислота		
Бодрствование	0,380±0,026 (11)	0,730±0,023 (14)
Лишение ПФС	0,550±0,023 (12)	0,990±0,032 (11)
	p<0,001	p<0,001

Примечание. В скобках указано число животных.

тонина в качестве субстрата в течение 30 мин при 37,5° в атмосфере O₂. Активность MAO выражали в нмоль NH₃/мин/мг белка. Количество аммиака, выделявшегося при дезаминировании серотонина, определяли методом нисслеризации после изотермической отгонки [9]. Содержание белка в пробах определяли модифицированным методом Lowry и соавт. [10]. Полученные данные статистически обрабатывали по Стьюденту-Фишеру. Как видно из приведенных в таблице данных, содержание серотонина в ткани среднего мозга бодрствовавших животных было на 14%

($p < 0,05$) ниже, чем в промежуточном и составляло соответственно 1,17 и 1,33 мкг/г. Содержание 5-ОИУК в среднем мозгу по сравнению с промежуточным оказалось также значительно меньше, что соответствует литературным данным [6]. Такие различия, по-видимому, связаны с тем, что именно в промежуточном мозгу оканчиваются синаптические терминалы многих серотонинергических нейронов и проходят основные нервные пути этих нейронов. Лишение же крыс ПФС в течение 24 ч не вызывало достоверных изменений количества серотонина в исследованных отделах мозга. Надо заметить, что, по сообщению Borbely [11], полное лишение сна—как медленноволновой фазы, так и ПФС—в течение 24 ч не влияло на содержание серотонина в переднем мозгу крыс. В то же время лишение ПФС в наших условиях вызывало заметное повышение содержания 5-ОИУК как в среднем мозгу (на 45%), так и в промежуточном (на 35%).

Активность МАО в митохондриальной и синапсомной фракциях ствола головного мозга бодрствовавших крыс, по нашим данным, составляла, соответственно, $7,45 \pm 0,48$ и $7,24 \pm 0,69$ нмоль $\text{NH}_3/\text{мин}/\text{мг}$ белка; это совпадает с величинами, установленными Горошинской и соавт. [12]. После 24-часового лишения крыс ПФС оказалось, что активность МАО в стволовых структурах головного мозга не изменялась. Так, ее активность (в нмоль $\text{NH}_3/\text{мин}/\text{мг}$ белка) в митохондриальной фракции составляла $8,36 \pm 0,46$, а в синапсомной— $7,81 \pm 1,20$ (разница с контрольными данными недостоверна).

Хотя есть некоторые данные [13], что предшественник серотонина 5-окситриптофан под влиянием трансаминазы ароматических аминокислот, избежав превращения в серотонин, может подвергаться переаминированию с последующим декарбоксилированием и окислением, также образуя 5-ОИУК, этот путь крайне ограничен [14]. Таким образом, основным источником 5-ОИУК в тканях остается только серотонин. Поэтому можно полагать, что результаты нашей работы свидетельствуют о том, что несмотря на данные о стабильности активности МАО в суммарных гомогенатах ствола мозга при лишении ПФС, оно сопровождается значительным повышением интенсивности метаболизма серотонина с поддержанием содержания последнего на уровне контроля.

SEROTONIN METABOLISM IN RAT BRAIN UNDER REM-SLEEP DEPRIVATION

U. M. MALIKOV and N. N. DOEMIN

Pavlov Institute of Physiology USSR Academy of Sciences, Leningrad

We demonstrated that in rats REM-sleep deprivation has no effect on serotonin level in mesencephalon and diencephalon or on the monoaminoxidase activity in the mitochondrial and synaptosomal fractions of the brain stem homogenate. However, REM-sleep deprivation is accompanied by the accumulation of 5-hydroxyindoleacetic acid, a product of

serotonin oxidative catabolism, in mesencephalon and diencephalon. These data may point out that REM-sleep deprivation leads to a considerable increase in the rate of serotonin metabolism in brain stem, whereas serotonin level remains unchanged.

ЛИТЕРАТУРА

1. Jouviet M. *Ergebn. Physiol.*, B. 64, S. 166—307, 1972.
2. Cespuglio R., Jouviet M. *Neurosci. Lett.*, v. 24, suppl. 7, p. 327, 1981.
3. Mendelson W. B., Cohen R. M., Campbell I. C., Murphy D. L., Gillin J. C., Wyatt R. J. *Pharmacol. Biochem. and Behav.*, v. 16, p. 429—431, 1982.
4. Jouviet D., Vimont P., Delorme F., Jouviet M. *Compt. r. Soc. biol.*, t. 158, p. 756—759, 1964.
5. Демин Н. Н.—В кн.: Вопросы биохимии нервной и мышечной систем, вып. 3 (под ред. В. Н. Чиквадзе), с. 155—160, Тбилиси, Мецниереба, 1979.
6. Curson G., Green A. R. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 39, p. 653—655, 1970.
7. Узбеков М. Г. *Онтогенез*, т. 12, с. 58—65, 1981.
8. Горкин В. Э., Веревкина И. В., Гриднева Л. И., Жердева Л. В., Кляшторин Л. Б., Кривченко Р. С., Комиссарова Н. В., Лсонтьева Г. А., Романова Л. А., Северина И. С., Фейлина С. М.—В кн.: Современные методы в биохимии, с. 155—177, М., Медицина, 1968.
9. Силакова А. И., Труш Г. П., Являкова А. *Вопр. мед. химии*, т. 8, с. 538—544, 1962.
10. Miller G. Z. *Anal. Chem.*, v. 31, p. 964, 1959.
11. Borbely A. A. *Behav. Brain Res.*, v. 1, p. 205—210, 1980.
12. Горошинская Н. А., Грабовская Л. Л., Броницкая Э. Г., Кричевская А. А. *Физиол. журн. СССР*, т. 67, с. 1611—1616, 1981.
13. Fonnum F., Haavaldsen R., Tangen O. J. *Neurochem.*, v. 11, p. 109—118, 1964.
14. Young S. N., Sourkes T. L.—In: *Adv. Neurochem.*, v. 2 (eds. B. W. Agranoff, M. H. Aprison), p. 133—191. New York—London, Plenum Press, 1977.

Поступила 20. IV 1988



УДК 612.766.1.014.49—98

ВЛИЯНИЕ ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ АДАПТАЦИИ К ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКЕ НА СОДЕРЖАНИЕ ИММУНОРЕАКТИВНОГО Leu-ЭНКЕФАЛИНА ВО ФРОНТАЛЬНОЙ КОРЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ СТРЕССЕ

МЕЕРСОН Ф. З., ДМИТРИЕВ А. Д., ПШЕННИКОВА М. Г.,
ОРЛОВА З. Х., РОЖИЦКАЯ И. И.

НИИ общей патологии и патофизиологии АМН СССР,
ВНЦ психического здоровья АМН СССР, Москва

В настоящее время показано, что адаптация к физическим нагрузкам подобно адаптации к кратковременным стрессорным воздействиям и высотной гипоксии [1] эффективно предупреждает стрессорные нарушения сократительной функции сердца и его ишемические аритмии [2]. Для понимания механизма этого защитного эффекта существенно, что в патогенезе таких аритмий важное место занимает детерминированное стрессом инертное возбуждение структур фронтальной коры головного мозга, иррадирующее на нижележащие адренергические центры гипоталамуса и ствола мозга [3]. Установлено, что в защитном эффекте адаптации к стрессорным воздействиям и высотной гипоксии важную роль играет активация стресслимитирующих систем организма, проявляющаяся, в частности, в повышении в головном мозгу уровня ГАМК, серотонина и опиоидных пептидов (ОП) и способствующая ограничению стрессорного возбуждения адренергических центров [1]. Роль стресслимитирующих систем в защитном эффекте адаптации к физическим нагрузкам малоизучена. В соответствии с этим в настоящей работе определяли содержание Leu-энкеφαлина (ЛЭ) во фронтальной коре головного мозга крыс при адаптации к физической нагрузке и последующем иммобилизационном стрессе.

Опыты проводили на 4-х группах крыс-самцов линии *Wistar* массой 300—350 г: интактных (контроль), перенесших стресс, адаптированных к физической нагрузке и адаптированных животных, перенесших стресс. Животных адаптировали к плаванию без груза при 32° в течение 7 недель по 5 раз в неделю. Площадь поверхности воды на животное составляла 400—440 см², продолжительность плавания в I, II, III и последующие дни—15, 30, 45 и 60 мин соответственно. Стрессорное воздействие осуществляли путем иммобилизации животных на спине в течение

10 ч. Крыс декапитуировали, мозг быстро извлекали и отмывали от крови физиологическим раствором pH 7.4. Фронтальную кору отделяли, быстро взвешивали, замораживали в жидком азоте и сохраняли до определения содержания ЛЭ при -70° . Измеряли длину язвенных поражений желудка. Экстракты ЛЭ получали согласно работе [4]. Количество ЛЭ определяли радиоиммунологически, как описано ранее [5]. Перекрестная активность к Met-энкефалину составляла 0,9%, к α -, β - и γ -эндорфинам—менее 0,01%. Обработку результатов проводили по Стьуденту.

Таблица

Влияние предварительной адаптации к физической нагрузке на содержание Leu-энкефалина во фронтальной коре головного мозга и язвенные поражения слизистой оболочки желудка крыс при иммобилизационном стрессе

Группа и число животных	Содержание Leu-энкефалина, фмоль/мг ткани	Число животных с поражениями	Длина язв, мм
Контроль (7)	32 ± 8	0	0
Стресс (8)	$12 \pm 1^*$	6	$3,1 \pm 1,7$
Адаптация (9)	$64 \pm 10^*$	0	0
Адаптация + стресс (9)	$34 \pm 12^{**}$	5	$1,7 \pm 0,7$

Примечание. Достоверность различия от контроля $^*p < 0,05$; от группы со стрессом $^{**}p < 0,05$.

Данные, представленные в таблице, показывают, что 10-часовой иммобилизационный стресс приводит к снижению количества ЛЭ во фронтальной коре мозга у неадаптированных животных в 3 раза по сравнению с контролем. У животных, адаптированных к физической нагрузке, уровень ЛЭ возрастал в 2 раза. Адаптация полностью предупреждала снижение уровня ЛЭ во фронтальной коре при стрессе и существенно ограничивала развитие стрессорных поражений слизистой желудка. В группе неадаптированных крыс такие поражения при стрессе наблюдались у 75% животных, в группе адаптированных—у 56%. При этом число и интенсивность поражений были примерно вдвое меньше.

В тканях количество ОП определяется соотношением интенсивностей их секреции синтеза и утилизации. Снижение количества ЛЭ во фронтальной коре при таком стрессе, как 10-часовая иммобилизация, может быть результатом активации секреции и утилизации ЛЭ и «отставленностью» активации его синтеза. Это согласуется с данными об увеличении «выброса» и роли ОП при непродолжительном стрессе у животных [6] и фазном характере сдвигов уровня ОП в различных отделах головного мозга при долговременном стрессе и адаптации к стрессу [7, 8]. Механизм увеличения количества ЛЭ при адаптации пока неясен. Можно думать, что это увеличение связано с повышением мощности аппарата синтеза ОП и ЛЭ в частности. Это адаптационное изменение является, по-видимому, основной причиной предупреждения падения содержания ЛЭ во фронтальной коре при стрессе у адаптированных животных. Известно, что ОП

способны модулировать функционирование ряда нейрогормональных регуляторных механизмов на центральном и периферическом уровнях [9, 10]. Например, ограничивать адренергическую активность путем угнетения пресинаптического высвобождения медиатора и постсинаптического его действия [11], ограничивать холинергическую передачу [9] и др. Это позволяет полагать, что активация системы ОП в мозгу может способствовать ограничению стрессорного возбуждения. В частности, возмещение уровня ЛЭ во фронтальной коре может уменьшать очаги инертного возбуждения в этой области мозга при стрессе. Полученные данные позволяют предположить, что в защитном эффекте адаптации к физическим нагрузкам при стрессорных и ишемических повреждениях сердца существенное место принадлежит увеличению резервов ЛЭ и, возможно, других ОП во фронтальной коре больших полушарий.

Установленное ограничение стрессорных язвенных поражений желудка у адаптированных животных согласуется с данными других авторов [12] и наблюдениями в клинике, свидетельствующими, что у людей, тренированных к физическим нагрузкам, частота возникновения и тяжесть язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки значительно меньше, чем у нетренированных [13]. В механизме этого защитного эффекта адаптации к физическим нагрузкам, по-видимому, играет роль активация системы ОП в головном мозгу. В соответствии с этим показано, что предварительное введение животным D-Ala²-Met⁵-энкефалина в желудочки мозга уменьшает количество язвенных поражений слизистой желудка более чем в 2 раза при тяжелом иммобилизационном стрессе [14]. В целом, полученные данные свидетельствуют, что активация системы ОП является одним из компонентов адаптации к физическим нагрузкам и может играть существенную роль в широком защитном эффекте адаптации.

THE EFFECT OF PREADAPTATION TO PHYSICAL EXERCISE ON THE LEVEL OF IMMUNOREACTIVE LEU-ENKEPHALIN IN THE CEREBRAL CORTEX DURING STRESS

F. Z. MEERSON, A. D. DMITRIEV, M. G. PSHENNIKOVA, E. N. ORLOVA,
and I. I. ROZHITSKAYA

Institute of General Pathology and Pathological Physiology, USSR Academy
of Medical Sciences, National Research Center of Mental Health, USSR
Academy of Medical Sciences, Moscow

Adaptation to the physical stress of swimming during 7 weeks increases by a factor of two the level of Leu-enkephalin in the rat frontal cortex. This adaptation prevents decrease in the level of this peptide in the frontal cortex induced by 10 hours of the immobilization stress. Furthermore, the adaptation prevents the formation of stomach stress ulcers. These data provide evidence that the increased level of Leu-enkephalin in brain cortex is a part of organism adaptation to the physical exercise and probably plays an important role in the protective effect of adaptation in stress.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мессерон Ф. Э. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца, М., Медицина, 1984.
2. Billman G. E., Schwartz P. J., Stone H. L. *Circulation*, v. 69, № 6, p. 1182—1189, 1984.
3. Skinner J. E.—In: *Stress and Heart Disease* (eds. R. E. Beamish, P. K. Singal, N. S. Dhalla), p. 44—59, Boston, Martinus Nijhoff, 1985.
4. Rossier J., Bayon A., Vargo T. M., Ling N., Guillemin R., Bloom F. *Life Sci.*, v. 21, № 6, p. 847—852, 1977.
5. Дмитриев А. Д., Голикова Ю. И., Кобылянский А. Г., Савоилова Н. Н., Трушина Е. Д., Ярыгин К. Н., Беспалова Ж. Д., Азьмук А. А., Сачс Т. Р. *Нейрохимия*, т. 2, с. 66—74, 1982.
6. Пшенникова М. Г. Патол. физиология и эксперим. терапия, № 3, с. 85—90, 1988.
7. Вакулина О. П., Тизранян Р. А., Брусев О. С. *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 98, № 11, с. 537—539, 1984.
8. Тизранян Р. А., Вакулина О. П. *Косм. биол. и авиакосм. мед.*, т. 18, № 6, с. 63—66, 1984.
9. Голанов Е. В. Современное состояние проблемы эндогенных морфиноподобных веществ. М., ВНИИММТИ, серия фармакология и фармация, вып. 1, 1986.
10. Вальдман А. В. *Вопр. мед. химии*, т. 30, № 3, с. 56—63, 1984.
11. Bellet M., Elghozi J.—L., Mayer Ph.—In: *Brain peptides: a new endocrinology*, p. 365—371, Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1979.
12. Tharp G. D., Jackson J. L. *Med. Sci. Sports*, v. 7, p. 84, 1975.
13. Frenkl R., Csaly L., Juhasz J., Kunos F. *Testnev. Sporteg. Sz.*, v. 6, p. 213—221, 1965.
14. Morley J. E., Levine A. S., Silva S. E. *Life Sci.*, v. 31, № 7, p. 693—699, 1982

Поступила 27. IV 1988



УДК 577.152.311.1.042:

МЕТИЛСУЛЬФОМЕТИЛАТЫ О-АЛКИЛ-S-(β -ЭТИЛМЕРКАПТО-
ЭТИЛ) МЕТИЛТИОФОСФОНАТОВ КАК ЭФФЕКТОРЫ
ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗ
РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

АБДУВАХАБОВ А. А., *ГРИГОРЬЕВА Г. М., ТИЛЯБАЕВ З.

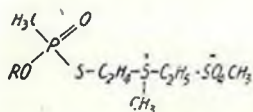
Институт биоорганической химии АН УзССР, Ташкент

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

Холинэстераза (ХЭ) играет важную роль в передаче нервных импульсов в холинергических синапсах позвоночных и беспозвоночных животных, где химическим медиатором является АХ [1]. ХЭ различного происхождения обладают рядом таких общих признаков и свойств, как способность катализировать гидролиз холиновых эфиров, взаимодействовать с тетраалкиламмониевыми ионами, а также угнетаться фосфорорганическими соединениями (ФОС) и карбаматами [2]. Выделены два основных типа ХЭ—АХ-ацетилгидролаза (К.Ф. 3.1.1.7) и ацилхолин-гидролаза (К.Ф. 3.1.1.8). Однако в настоящее время найдены разновидности ХЭ, которые отличаются от ферментов двух названных типов [3—5]. Наиболее вероятной причиной различий в свойствах ХЭ являются отличия в деталях структуры их активного центра. Удобными инструментами для исследования структуры активного центра ХЭ являются их специфические ингибиторы. Среди них особое место занимают ФОС. Для проявления максимальной эффективности ФОС необходимо структурное соответствие между гидрофобными участками каталитического центра и гидрофобными радикалами эффера. В результате анализа антиферментной активности ФОС с планомерно изменяющимся строением молекулы можно получить данные об отличительных особенностях структуры активного центра различных ХЭ. Такой подход к изучению ХЭ известен в литературе как метод ингибиторного анализа [6]. Этот метод особенно важен для сравнительных исследований, поскольку использование специфических ФОС в качестве эфферов дает возможность изучать недостаточно очищенные ферменты, а в ряде случаев и гомогенаты тканей.

Целью настоящей работы являлось исследование особенностей структуры активного центра ХЭ нервной ткани беспозвоночных (моллюски и

насекомые) и неизученные ранее ХЭ позвоночных с помощью метилсульфометилатов О-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов с общей формулой:



где R—алкильный радикал $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$ изменяется от 1 до 7.

Источником бутилхолинэстеразы (БуХЭ) служила нервная ткань зрительных ганглий головного кальмара *Todarodes sagittatus* L.

Пропионилхолинэстераза (ПрХЭ) была получена из нервной ткани (окологлоточные ганглии) брюхоногого моллюска *Lymnaea stagnalis* [3]. Кроме того, использовали ХЭ нервных ганглиев саранчи *Locusta migratoria migratorioides* L. и американского таракана *Periplaneta americana* L. (гомогенаты), АХЭ электрического органа ската *Torpedo marmorata* (гомогенат) и частично очищенный препарат АХЭ эритроцитов крови человека производства Пермского НИИ вакцин и сывороток.

Метилсульфометилаты О-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов синтезированы по ранее описанной методике [7]. Антихолинэстеразную активность ФОС оценивали по величине бимолекулярной константы (k_2) скорости ингибирования ХЭ, которую определяли графически [8], исходя из уравнения:

$$k_2 = \frac{2.3}{[I]} \times \lg \frac{V_0}{V_t},$$

где: V_0 —исходная активность ХЭ; V_t —остаточная активность после инкубации фермента с раствором ФОС в течение 1 мин. [I]—использованная концентрация раствора ФОС. Активность АХЭ эритроцитов человека, электрического органа ската, БуХЭ и ПрХЭ определяли методом потенциометрического титрования [9] при pH 7.5 и температуре 25°. В качестве субстратов использовали йодиды АХ («Хемапол», ЧССР), бутилхолина, пропионилхолина («Реахим», СССР). Активность ХЭ насекомых измеряли методом Ellman и соавт. [10], используя ацетилтиохолин йодид («Хемапол», ЧССР) в качестве субстрата и 5,5'-динитробис-2-нитробензойную кислоту («Koch Light Laboratories», Англия) в качестве хромогена. Реакционная среда имела pH 7.5 и температуру 25°.

Исследования ФОС, как видно из их структуры, содержат сульфонируемую серу в отщепляемой части молекулы и алкильные радикалы различной протяженности у атома фосфора. Катионсодержащая часть таких ФОС взаимодействует с анионным участком активного центра ХЭ и определенным образом ориентирует молекулу ингибитора по отношению к эстеразному участку. При этом алкильные радикалы атома фосфора сорбируются на гидрофобных областях эстеразного участка. Зависимость ан-

тихолинэстеразного действия ФОС от размера их алкильных радикалов позволяет судить о размерах гидрофобных областей эстеразного участка ХЭ. Ранее было проведено исследование гидрофобных областей анионного и эстеразного участка типичных ХЭ, главным образом, позвоночных животных [11—13].

Результаты исследования зависимости антихолинэстеразного действия метилсульфометилатов О-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов от протяженности алкильного радикала R в фосфорильной части молекулы представлены на рисунке.

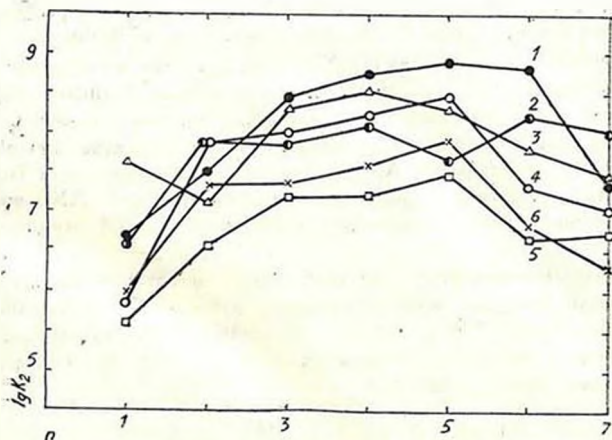


Рис. Зависимость антихолинэстеразного действия метилсульфометилатов О-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов (k_2) от числа (n) углеродных атомов в О-алкильном радикале для ПрХЭ брюхоногого моллюска (1), БуХЭ кальмара (2), АХЭ электрического органа ската (3), АХЭ эритроцитов крови человека (4), ХЭ саранчи (5), ХЭ таракана (6)

Наиболее высокие величины k_2 получены для ПрХЭ брюхоногого моллюска. Величины k_2 существенно меняются с изменением длины R: с увеличением R до определенного предела наблюдается возрастание k_2 . Наиболее высокие величины k_2 с различными ХЭ получены для ФОС с О-бутильным (АХЭ ската, ХЭ таракана), с О-пентильным (АХЭ эритроцитов человека, ПрХЭ, ХЭ саранчи) и О-гексильным радикалами (БуХЭ кальмара). При этом для разных ХЭ с увеличением длины, а следовательно, и гидрофобности R наблюдается различное усиление антихолинэстеразного действия ФОС. Так, при переходе от О-метильного радикала к О-бутильному величина k_2 возрастает для АХЭ ската примерно в 7 раз, для БуХЭ кальмара—в 30 раз, а для ХЭ таракана—в 70 раз. Для другого ряда ферментов, где максимум активности ФОС наблюдается при R, равным C_5H_{11} , удлинение радикала от метильного до пентильного приводит к росту k_2 для ХЭ саранчи в 70 раз, для ПрХЭ брю-

хоногого моллюска в 170 раз, а для АХЭ эритроцитов человека в 500 раз. После вышеуказанных максимальных значений k_2 антихолинэстеразное действие, как правило, снижается при увеличении R. Это свидетельствует о том, что гидрофобная область в активном центре ХЭ, с которой взаимодействует R, прерывается, а длина радикала, для которого наблюдается максимальная величина k_2 , соответствует протяженности гидрофобной области.

После некоторого спада величины k_2 для БуХЭ кальмара и ФОС с пентильным радикалом наблюдается заметное повышение антихолинэстеразного действия ФОС с гексильным радикалом (рисунок).

Таким образом, возрастание числа метиленовых группировок в алкоксильном радикале фосфорильной части ФОС приводит к усилению сорбции этого радикала на соответствующих гидрофобных областях эстеразного участка исследованных ХЭ за счет гидрофобного взаимодействия.

На основании вышесказанного можно сделать заключение о том, что исследованные ХЭ имеют различное гидрофобное окружение эстерофильной группировки в эстеразном участке. Для АХЭ ската и ХЭ таракана гидрофобная область в эстеразном участке пространственно соответствует бутильному радикалу. У ХЭ саранчи, ПрХЭ брюхоногого моллюска и АХЭ эритроцитов человека эта гидрофобная область соответствует протяженности пентильного, а у БуХЭ кальмара—гексильного радикала, как и у ранее исследованной типичной БуХЭ сыворотки крови лошади [14]. У БуХЭ кальмара, как и у БуХЭ сыворотки, в районе эстеразного участка имеется, по-видимому, гидрофильная группировка, которая разделяет гидрофобную область эстеразного участка на две части, при этом ближайшая из них к эстерофильной группировке соответствует протяженности бутильного радикала, как гидрофобная область в эстеразном участке АХЭ электрического органа ската и АХЭ бычьих эритроцитов [15].

На основании результатов исследования антихолинэстеразного действия метилсульфометилатов О-алкил-S-(β -этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов с возрастающей протяженностью нормального алкильного радикала можно заключить, что ХЭ из разных источников имеют различия, а в ряде случаев некоторое сходство в структуре гидрофобных областей эстеразного участка. Обнаруженные различия в структуре гидрофобных областей активного центра, вероятно, определяют разную субстратную специфичность ХЭ.

METHYLSULFOMETHYLATES OF O-ALKYL-S-(BETA-ETHYLMERCAPTOETHYL) METHYLTHIOPHOSPHONATES AS EFFECTORS FOR STUDYING CHOLINESTERASES OF DIFFERENT ORIGIN

A. A. ABDUVAKHABOV, G. M. GRIGOR'EVA*, and Z. TILYABAEV

Institute of Bioorganic Chemistry, Uzbek Academy of Sciences, Tashkent
and *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry,
USSR Academy of Sciences, Leningrad

The anticholinesterase effect of several organophosphorus compounds (OPC) having general formula $\text{CH}_3(\text{RO})_2\text{P}(\text{O})\text{SC}_2\text{H}_4\text{SCH}_2(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{SO}_2\text{CH}_3$ has been examined (R is the hydrocarbon radical from CH_3 to C_7H_{13}) using cholinesterases (ChEs) from the nerve tissue of mollusks, fish and insects. The inhibitory efficiency of OPC, expressed in terms of the second order rate constant (k_2), increases with the increase in the length of R. The dependence of k_2 on R for the investigated ChEs was nonidentical, it is associated with differences in the structure of hydrophobic sites of the esterase onto which the alkyl radicals of OPC are adsorbed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Уиттекер В. П.—В кн.: Сравнительная фармакология синаптических рецепторов. Труды международного симпозиума, 1975, г., с. 15—26, Л., 1977.
2. Brestkin A. P., Brick I. L., Grigorjeva G. M.—In: International Encyclopedia of pharmacology and Therapeutics, Sect. 85, v. 1, p. 241—344, Pergamon Press, New York—London, 1973.
3. Григорьева Г. М. Биохимия, т. 45, № 12, с. 2176—2188, 1980.
4. Григорьева Г. М. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 18, № 2, с. 205—206, 1982.
5. Григорьева Г. М. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 23, № 4, с. 433—440, 1987.
6. Садыков А. С., Розенгарт Е. В., Абдувахобов А. А., Асланов Х. А. Холинэстеразы. Активный центр и механизм действия. Ташкент, Фан, 1976.
7. Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Кабачник М. И., Мазаланик Л. Г., Матрющкова Т. А., Михельсон М. Я., Рожкова Е. К., Фруентов Н. К., Яковлев В. А. Вогр. мед. химии, № 7, с. 250—258, 1961.
8. Бресткин А. П., Брик И. А., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Гурдалиев Х. Х., Кабачник М. И., Карданов Н. А. Докл. АН СССР, т. 200, с. 103—106, 1971.
9. Яковлев В. А. Кинетика ферментативного катализа. М., Наука, 1965.
10. Ellman G. L., Courtney K. D., Anders V., Featherstone R. M. Biochem. Pharmacol., v. 7, p. 88—95, 1961.
11. Пархоменко Т. В. Автореферат канд. дисс. Л., 1972.
12. Пархоменко Т. В. Реакционная способность органич. соединений, т. 8, вып. 3, с. 653—661, 1971.
13. Бресткин А. П., Розенгарт Е. В., Эпштейн Л. М. Журн. эволюц. биохимии и физиологии, т. 7, № 5, с. 474—477, 1971.
14. Кабачник М. И., Абдувахобов А. А., Атабекова И. И., Бресткин А. П., Волкова Р. И., Годовиков Н. Н., Годына Е. И., Михайлов С. С., Михельсон М. Я., Розенгарт В. И., Розенгарт Е. В., Ситкович Р. В. Успехи химии, т. 39, вып. 6, с. 1050—1072, 1970.
15. Абдувахобов А. А. Автореферат канд. дисс. М., 1968.

Поступила 4. V 1988



УДК 611+127-005.8-0.36

КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ ФОСФОЛИПИДОВ И ИХ ЖИРНОКИСЛОТНОГО СОСТАВА В ГОЛОВНОМ МОЗГУ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ОДНОСТОРОННЕЙ ГАНГЛИОСИМПАТЭКТОМИИ

КАРАГЕЗЯН К. Г., ОВЕЯН Г. А., ОВСЕПЯН А. М., СУКИАСЯН А. В.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

*Ереванский государственный медицинский институт

Липидный состав мозговой ткани практически постоянен и остается неизменным даже под влиянием различных внешних факторов, таких, как диета, стрессовые состояния, резко меняющие липидный состав висцеральных органов и плазмы. Поэтому изменение липидов мозговой ткани можно рассматривать как симптом надвигающегося патологического состояния [1, 2]. При этом особое внимания заслуживает изменение обмена фосфолипидов (ФЛ), составляющих, как известно, больше половины содержания всех липидов и являющихся главными липидными компонентами биологических мембран и миелина. В связи с отмеченным изучение нарушений филогенетически стабилизированного статуса ФЛ—ФЛ соотношений [2, 3] в мозговой ткани при различных патологических состояниях организма приобретает особо важное значение.

Целью настоящего исследования явилось выявление изменений качественного и количественного состава ФЛ и их жирнокислотного (ЖК) спектра в головном мозгу при односторонней ганглиосимпатэктомии.

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах массой 180—200 г, содержащихся на обычном пищевом рационе. Правый верхний шейный симпатический узел удаляли под легким эфирным наркозом. О достоверности произведенной операции судили по развивающемуся синдрому Клода-Бернара-Горнера (четко выраженный энтофтальм, сужение глазной щели и зрачка). Животных декапитировали под легким эфирным наркозом через 7 суток после экстирпации узла. Экстракцию ФЛ производили из ацетоновых порошков мозговой ткани по методу J. Folch [4] в модификации Карагезяна [5]. Фракционирование индивидуальных ФЛ осуществляли с помощью одномерной хроматографии в тонком слое силикагеля марки КСК в системе растворителей хлороформ: метанол:аммиак в соотношении 65:35:5. Идентификацию пятен ФЛ производили с

Таблица 1
Состав фосфолипидов головного мозга крыс при односторонней
гемисфалэктомии (абсолютные количества,
МЭм и % от суммы фосфолипидов)

Фосфолипиды	Контрольный мозг		Правое полушарие			Левое полушарие		
	МКГ ФА на 1 мг су- хой ткани	% от суммы	МКГ ФА на 1 мг сухой ткани	% от суммы	% отклонения от кон- троля	МКГ ФА на 1 мг сухой ткани	% от суммы	% отклонения от кон- троля
Азидофосфатидилахолина	5,75±0,49	3,1	13,375±0,28 ^a	7,1	>132,6	9,17±0,28 ^a	4,4	>59,5
Фосфатидилахолина	67,56±0,67	36,3	62,54±0,16 ^a	33,0	<7,4	58,67±0,73 ^a	28,1	<13,2
Фосфатидиластаноллина	34,19±0,67	18,4	42,67±0,48 ^a	22,5	>24,8	45,71±0,24 ^a	21,9	>33,7
Сфингомиелин	18,56±0,42	10,0	16,21±0,08 ^b	8,5	<12,7	34,375±0,48 ^a	16,5	>85,2
Монофосфоглицериды	25,75±0,24	13,9	19,04±0,12 ^a	10,0	<26,1	21,67±0,40 ^a	10,4	<15,9
Фосфатидилсерин	17,31±0,30	9,3	18,45±0,20 ^a	9,7	>6,6	18,00±0,16	8,6	>4
Кардиолипиды+фосфоти- динные кислоты	16,75±0,12	9,0	17,375±0,24 ^a	9,2	>3,3	21,1±0,24 ^a	10,1	>26
Общее количество	185,86±1,46	100	189,66±0,48 ^a	100	>2	208,64±1,27 ^a	100	>12,3
Коэффициент Нейтральное ФА/кис- лые ФА	2,11		2,46		>16,6	2,44		>15,6

Примечание. а— $p < 0,001$, б— $p < 0,01$, в— $p < 0,02$, г— $p > 0,02$.

помощью химически чистых свидетелей производства «Sigma» (США). Минерализацию липидного фосфора осуществляли в среде серной и азотной кислот с последующим пересчетом его содержания на мкг/1 мг сухой ткани [6]. Метиловые эфиры ЖК ФЛ получали по методу Шторфеля [6]. Состав высших ЖК ФЛ определяли методом ГЖХ на хроматографе «Хром-5» (ЧССР) с пламенноионизационным детектором. Идентификацию метиловых эфиров ЖК проводили путем сравнения с хроматограммой смеси насыщенных и ненасыщенных метиловых эфиров ЖК с длиной углеродной цепи C_{14-22} .

Как видно из табл. 1, качественный и количественный состав ФЛ претерпевает выраженные ассиметрические изменения. В правом полушарии со стороны эктомированного ганглия отмечается резкое увеличение (примерно в 2,3 раза) количества лизофосфатидилхолинов (ЛФХ), что, по всей вероятности, обусловлено повышением активности фосфолипазы A_2 . Такое изменение уровня ЛФХ может оказать ингибирующее действие на метаболизм митохондрий путем резких структурных и функциональных нарушений по внутренней митохондриальной мембране [7]. Увеличение количества ЛФХ с одной стороны, и уменьшение уровня холинсодержащих ФЛ, в частности фосфатидилхолинов (ФХ) и сфингомиелинов (СФМ), входящих в состав наружного слоя миелина, с другой—говорит о возможных ультраструктурных нарушениях. Несмотря на эти сдвиги, количество фосфатидилсеринов (ФС) и фосфатидилэтаноламинов (ФЭА), локализованных в основном во внутреннем слое миелина, претерпевает некоторый сдвиг в сторону увеличения, что, по всей вероятности, может оказать стабилизирующее действие на структурную организацию миелина [1, 2, 7]. Не менее важным представляется также уменьшение (примерно на 26%) количества монофосфоинозитидов (МФИ), которые, как известно, в отличие от других ФЛ, вовлекаются преимущественно в функциональную активность клеточных и синаптических образований. Следовательно, не исключено, что убыль содержания МФИ может явиться одной из причин нарушения нервной проводимости. Изменение качественного и количественного состава ФЛ чревато расстройствами ФЛ—ФЛ соотношений особенно между нейтральными и кислыми представителями этих соединений. Это сопровождается заметными отклонениями в структуре и функции клеточных мембран [8], в частности, сдвигами в активности мембраносвязанных липидзависимых ферментов, интенсивности течения реакций ПОЛ, приводящими в целом к нарушению процессов регуляции гомеостаза мозговых клеток [8, 9].

В левом полушарии (с интактной стороны) при статистически достоверном увеличении общего количества ФЛ (примерно на 12%), возрастание уровня ЛФХ происходит в меньшей степени, чем это имеет место в отношении содержания ФХ. Количество же СФМ, напротив, претерпевает несравненно резкое увеличение (приблизительно на 85%), что, вероятно, носит компенсаторно-адаптационный характер.

Интересные изменения при изученной патологии обнаруживаются и в ЖК спектре ФЛ мозговой ткани. Установлено, что содержание полине-

новых ЖК, в частности, арахидоновой кислоты в ФЛ правого полушария уменьшается, в то время как в левом полушарии их уровень проявляет тенденцию к некоторому увеличению (табл. 2). Подобные сдвиги могут привести к существенному изменению статуса обменяемости ФЛ, следовательно, к соответствующим нарушениям мембранной морфологии и функциональной активности субклеточных структур [10].

Таблица 2

Жирынокислотный состав фосфолипидов головного мозга
белых крыс при односторонней ганглиосимпатэктомии
(% от суммы жирных кислот; $M \pm m$)

Жирные кислоты	ЖК ФЛ мозга контроль	ЖК ФЛ правого полушария	ЖК ФЛ левого полушария
C _{14:0}	0,21±0,002	0,25±0,005	0,41±0,04*
C _{14:1}	0,21±0,004	0,20±0,002	0,32±0,03*
C _{15:0}	следы	следы	0,61±0,05
C _{15:1}	1,29±0,06	1,26±0,01	1,10±0,03
C _{16:0}	25,79±0,14	26,76±0,06*	26,69±0,09*
C _{16:1}	1,96±0,04	1,97±0,03	1,88±0,08
C _{17:0}	следы	следы	0,66±0,04
C _{17:1}	1,56±0,006	2,08±0,01*	1,94±0,14*
C _{18:0}	28,71±0,17	29,96±0,13*	27,34±0,43*
C _{18:1}	28,22±0,12	29,30±0,19*	26,92±0,32
C _{18:2}	3,27±0,09	2,13±0,06*	2,96±0,36
C _{20:0}	0,91±0,01	0,87±0,06	0,34±0,08*
C _{20:1}	1,09±0,14	0,46±0,06*	1,72±0,33
C _{20:4}	6,81±0,02	4,76±0,03*	7,17±0,01*
Насыщенные	55,6±0,025	57,84±0,14*	55,99±0,48
Моноеновые	34,31±0,031	35,26±0,16*	33,87±0,12
Полиеновые	10,09±0,056	6,90±0,03*	10,14±0,37

Примечание. а— $p < 0,001$, б— $p < 0,01$, в— $p < 0,02$, г— $p > 0,02$.

Полученные результаты показывают, что ганглиосимпатэктомию сопровождается изменениями ФЛ и ЖК, входящих в состав этих соединений, которые могут привести к нарушению функционирования мозговой ткани.

CHANGES OF RAT BRAIN PHOSPHOLIPIDS AND THEIR FATTY ACID COMPOSITION UNDER THE CONDITIONS OF UNILATERAL GANGLIOSYMPATHECTOMY

K. G. KARAGEZIAN, G. A. OVEYAN, L. M. OVSEPYAN,
and L. V. SUKIASYAN*

Institute of Experimental Biology, Armenian Academy of Sciences, Yerevan,
*State Medical Institute, Yerevan

Phospholipids and their fatty acid spectrum was studied in brain tissue under the conditions of unilateral gangliosympatectomy (ablation of high cervical right sympathetic ganglion). Gangliosympatectomy lead to significant changes in qualitative and quantitative composition of

phospholipids and their fatty acids. The results obtained throw more light on understanding the molecular mechanisms of adaptive-trophic actions of the sympathetic nervous system on the functional activity of brain cells.

ЛИТЕРАТУРА

1. Нейрохимия (под ред. М. И. Прохоровой), Ленинград, ЛГУ, 1982.
2. Крепс Е. М.—В кн.: Липиды клеточных мембран, Ленинград, Наука, 1981.
3. Крепс Е. М.—В кн.: Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира. XXII Баховские чтения, Ленинград, 1967.
4. Folch J. J. Biol. Chem., v. 146, p. 35—40, 1942.
5. Карапетян К. Г.—В кн.: Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма, Ереван, 1972.
6. Методы биохимических исследований (под ред. М. И. Прохоровой), Ленинград, ЛГУ, 1982.
7. Нейрохимия (под ред. А. А. Кричевской), Ростов-на-Дону, РГУ, 1977.
8. Бурлакова Е. Б., Джалябова М. Н., Гвахария В. О., Глушенко Н. Н., Молочкина Е. Н., Штолько В. Н.—В кн.: Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. Труды МОИП, т. 57, с. 113—140, М., Наука, 1982.
9. Алесенко А. В., Пальмина Н. П.—В кн.: Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. Труды МОИП, т. 57, с. 84—100, М., Наука, 1982.
10. Правдина Н. И. Успехи современной биологии, т. 79, № 2, с. 205—224, 1975.

Поступила 17. V 1983



УДК 616—001.8—053.1—06:616—008.9

ПОЛИПЕПТИДНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ СУБКЛЕТОЧНЫХ ОБРАЗОВАНИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ ГИПОКСИИ, ПЕРЕНЕСЕННОЙ НА РАННИХ СТАДИЯХ ИНДИВИДУАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ

УВАРОВА Т. М., КУЗНЕЦОВА Т. В.

НИИ педиатрии АМН СССР, Москва

Развивающийся мозг предъявляет повышенные требования к кислородному и субстратному обеспечению. Это связано с чрезвычайно высокой интенсивностью процессов синтеза биологических макромолекул, активным морфо- и гистогенезом. Кислородная недостаточность на ранних стадиях индивидуального развития приводит к нарушению формирования, дифференцировки и созревания различных структур и метаболических путей в нервной ткани. Даже однократная тяжелая гипоксия, перенесенная в антенатальном или перинатальном периоде, вызывает длительно текущий, многостадийный патологический процесс [1]. К сожалению, работы, посвященные изучению данного вопроса, немногочисленны [2—6].

Нами было предпринято изучение полипептидного состава белков субклеточных образований мозга крыс, перенесших острую гипоксию в последней трети внутриутробного развития.

В экспериментах использовали крыс линии *Wistar*. Антенатальную гипоксию моделировали по оригинальной методике Жуковой. Пурлина [7]. Под слабым эфирным наркозом у беременной крысы проводили срединную лапоротомию. Сквозь стенку матки, прозрачную в последней трети беременности, под сосуды пуповины подводили гладко отполированный металлический крючок. Осторожное подтягивание крючка позволяло полностью прекратить кровоток в сосудах пуповины. О состоянии плодов судили по частоте сердечных сокращений, регистрируемых на ЭКГ. Пережатие сосудов прекращали, когда частота сердечных сокращений плода достигала 45 ударов в мин при норме 250. В каждом опыте асфиксии подвергали одновременно четыре плода, остальные служили контролем. У контрольных плодов частота сердечных сокращений не падала ниже 220 ударов в мин. Плоды, перенесшие гипоксию, метили под-

кожным введением окрашенной массы, содержащей 10 г безводного ланолина, 3 г черной туши, 5000 единиц пенициллина. Оперативное вмешательство проводили на 18—19-й день внутриутробного развития. Самки донашивали беременность и рожали в срок.

Потомство исследовали на 30-й день жизни. Фракционирование коры больших полушарий и мозжечка проводили методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности сахарозы по Hajos [8]. При разделении субклеточных частиц объединяли ткань коры больших полушарий от четырех, а ткань мозжечка—от двенадцати опытных или контрольных животных.

Выделенные и осажденные центрифугированием обогащенные фракции, условно обозначенные как «ядра» (обогащение по данным электронной микроскопии 52%), «митохондрии» (72% всех частиц фракции), «спикатосомы» (85% всех частиц фракции) и «миелин» (миелинизированные участки нервных волокон), ресуспендировали в 0,01М трис-НСI буфере, рН 6,8, содержащем 0,1%-ный тритон X-100, центрифугировали при 1000 g в течение 30 мин для отделения агрегированных частиц и уменьшения загрязнения фракций. Белок в надосадочной фракции определяли по Lowry и соизм. [9].

Электрофорез белков полученных фракций (100—200 мкг белка) в ПААГ в присутствии ДДС-Na и 2-меркаптоэтанола проводили по Laemmli, [10]. Маркерами величины M_r служили (в кД): лактальбумин—14, ингибитор трипсина—20, карбоангидраза—30, овальбумин—43, бычий сывороточный альбумин—67, фосфорилаза—94 («Pharmacia», Швеция).

Гели денситометрировали на сканирующем спектрофотометре «Helepa» (Франция).

Установлено, что в ядерной фракции коры больших полушарий у перенесших гипоксию крыс происходит увеличение относительного количества полипептидов с M_r 20—24 кД (на 69,6%), снижение относительного количества полипептидов с M_r 53—59 кД (на 31%). В аналогичной фракции мозжечка уменьшается относительное содержание полипептидов с M_r 36 (на 23,5%) и 46 кД (на 27,8%) рис., а)

Состав белков «митохондрий» в коре больших полушарий изменяется под влиянием антенатальной гипоксии следующим образом: снижается вклад белков с M_r 61—81 кД (на 26%), 31 кД (на 55,6%); увеличивается относительная концентрация полипептидов с M_r 25—30 (на 38,0%), 34 (на 45,0%), 47 (на 33,3%) и 54 кД (на 60,0%). В «митохондриях» мозжечка в M_r наблюдаются сходные изменения: уменьшается относительное содержание полипептидов с M_r 61—81 (на 24,6%) и 31 кД (на 17,2%), увеличивается относительная концентрация полипептидов с M_r 54 кД (на 37,8%). Кроме того, в составе белков «митохондрий» мозжечка снижается доля белков с M_r 47 кД (на 20,0%) и возрастает относительное содержание полипептидов с M_r 57 кД (в 2 раза) (рис., б). Изменения состава белков по фракции, обогащенной митохондриями, захватывают интервал с величиной M_r , характерной для основ-

ных субъединиц ферментов окислительного метаболизма, синтезирующихся непосредственно в митохондриях и на цитоплазматических рибосомах [11]. Изменение соотношений между полипептидами фракции, обогащенной митохондриями, найденное в данной работе, может отражать или же быть причиной вторичного ухудшения состояния энергетического метаболизма нервной ткани в отдаленные сроки после антенатальной гипоксии.

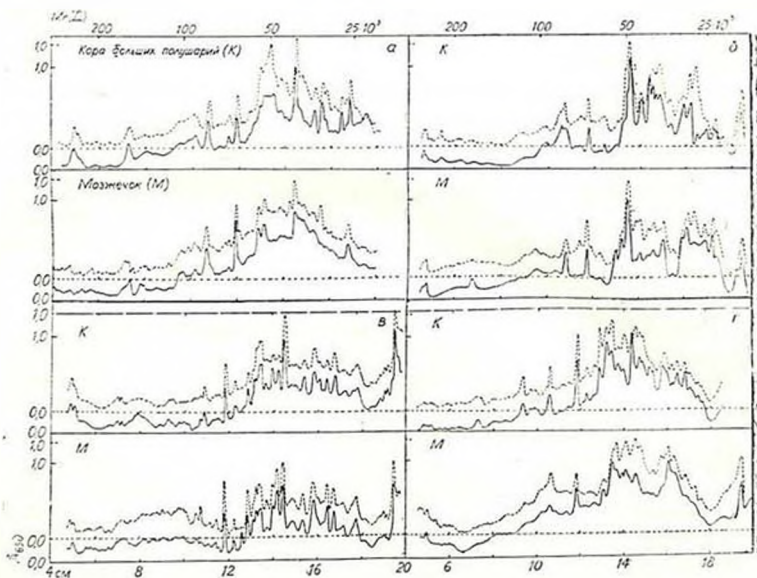


Рис. Электрофоретическое разделение белков фракций ядер (а), митохондрий (б), миелина (в) и синапсом (г) коры больших полушарий и мозжечка контрольных (1) и перенесших антенатальную гипоксию (2) крыс. По оси ординат—поглощение при длине волны 650 нм, по оси абсцисс—сверху—величина M_r (Д), снизу—длина геля, в см

В составе белков «миелина» мозжечка подопытных крыс происходит увеличение относительного количества белков с M_r 56 и 62 кД. В коре больших полушарий в составе белков «миелина» появляется дополнительная полипептидная фракция в области M_r 51–56 кД (рис., в). Этому интервалу M_r соответствуют обе субъединицы белка Вольфграма. Поскольку данный белок составляет более 20% всех белков миелина [12] и, по-видимому, представляет основную часть полипептидов этих фракций, можно предположить определенную роль этого специфического белка миелина в течение постгипоксического процесса.

Наиболее существенные изменения полипептидного состава белков после антенатальной гипоксии наблюдаются во фракции синапсом. В

составе белков этой субклеточной фракции коры больших полушарий происходят следующие изменения: повышается содержание полипептидов с M_r 38—39 кД (на 36,9%), появляется дополнительная полоса с M_r 34 кД, изменяется характер разделения полипептидов с M_r 43—46 кД, уменьшается относительное содержание полипептидов с M_r 59, 48 кД (на 25,4 и 21,8% соответственно). В синапсомной фракции мозжечка нарушения захватывают другие, чем в коре больших полушарий, диапазоны величины M_r : наблюдается снижение относительного количества белков с M_r 35 (на 20,4%) и 43 кД (на 20,0%), не выявляется фракция с M_r 41 кД, повышается относительная концентрация полипептидов с M_r 53—72 кД (на 22,9%) (рис. 2).

Таким образом, полученные в данной работе данные указывают на изменение состава белков исследованных субклеточных фракций головного мозга крыс, перенесших кислородное голодание на ранних стадиях онтогенеза.

Остается неясным, являются ли выявленные изменения патологическими или носят приспособительный характер. В любом случае изменения соотношения между полипептидами субклеточных фракций мозга свидетельствуют о структурных нарушениях, наступающих в отдаленные сроки после антенатальной гипоксии.

PROTEINS OF BRAIN SUBCELLULAR FRACTIONS OF RATS EXPOSED TO HYPOXIA IN EARLY ONTOGENESIS

T. M. UVAROVA and T. V. KUZNETSOVA

Institute of Pediatrics, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The influence of prenatal hypoxia on protein composition of brain subcellular fractions has been studied by SDS-PAGE. Experiments were carried out on 30 days old Wistar rats. Prenatal hypoxia resulted in changes of the proportion between proteins of different molecular weights. Proteins of the synaptosomal and mitochondrial fractions underwent most significant changes. The electrophoretic protein patterns of the cerebral cortex and cerebellum after prenatal hypoxia were different.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жукова Т. П., Знаменская Е. И., Паласова Н. Г. — В кн.: Перинатальная патология (под ред. М. Я. Студеникина, Ю. Кюльца, Г. Эггерса), с. 45—82, М., Медицина, 1984.
2. Meberg A. Neonate, v. 39, № 5—6, p. 272—282, 1981.
3. Жукова Т. П., Сорокина Е. Г., Уварова Т. М. Вестн. АМН СССР, № 6, с. 25—31, 1985.
4. Gross J., Burgoyne R. D., Rose S. P. R. J. Neurochem., v. 37, № 1, p. 229—237, 1981.

5. Жукова Т. П., Сорокина Е. Г., Плат Х., Рихтер Н.—В кн.: Перинатальная патология (под ред. М. Я. Студеникина, Ю. Кюльца, Г. Эггедса), с. 83--104, М., Медицина, 1984.
6. Турова Н. Ф., Барышников В. А. Нейрохимия, т. 1, № 3, с. 249—253, 1982.
7. Жукова Т. П., Пурин В. Р. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 64, № 7, с. 123—125, 1967.
8. Hajos F. Brain Res., v. 93, № 3, p. 485--489, 1975.
9. Lowry O. H., Rosenbrough N. T., Farr A. L., Randall R. T. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
10. Luettmli U. K. Nature, v. 227, № 5259, p. 680—685, 1970.
11. Озернюк Н. Д. Рост и воспроизводство митохондрий, М., Наука, 1978.
12. Туманова Ю. С., Прохорова М. И.—В кн.: Биохимия липидов и их роль в обмене веществ, М., Наука, 1981.

Поступила 4. III 1988

Белки нейронов и глии. Структура, функция и клиническое применение. Под ред. P. J. Naraugos, R. M. Cohen, I. C. Cambell, изд. Academic Press, Лондон, Англия, 1988 г., 382с.

Neuronal and Glial Proteins. Structure, Function and Clinical Application. Ed. by P. J. Naraugos, R. M. Cohen, I. C. Campbell. Academic Press, London, England, 1988, 382с.

Книга представляет собой обзор, посвященный описанию идентифицированных к настоящему времени белков нейронов и глии, в том числе антигена Thy-1, факторов роста, PGP-9,5 и ассоциированных с миелином гликопротеинами. Клиническое исследование белков мозга особенно необходимо в таких случаях, как маркеры опухолей, дифференцировка и маркеры типов клеток. Книга необходима нейробиологам и молекулярным биологам, интересующимся молекулярными аспектами деятельности мозга и нервной системы, а также исследователям, занимающимся потенциальными возможностями клинического использования белков мозга. Среди заголовков отдельных разделов: «Методы идентификации и модификации белков мозга», «Растворимые белки нервной системы», «Мембранные белки нервной системы».



УДК 611.81:577.152.12

АЛЬДЕГИДДЕГИДРОГЕНАЗА МОЗГА ЛИНЕЙНЫХ КРЫС,
РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ОТНОШЕНИЕМ К АЛКОГОЛЮ

ЗИМАТКИН С. М., ЛИНДРОС К. О.

Институт биохимии АН БССР, Гродно
Исследовательские лаборатории Финской государственной
алкогольной монополии «АЛКО», Хельсинки

Генетические факторы играют важную роль в этиологии и патогенезе алкоголизма [1]. Поскольку изучение врожденных особенностей метаболизма мозга у людей с различным отношением к алкоголю трудно осуществимо, особое значение приобретают исследования на линиях животных, генетически различающихся по их отношению к этанолу [2]. Настоящая работа посвящена сравнительному изучению в некоторых структурах ЦНС таких животных альдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.3; АльДГ), активность которой прямо связана с уровнем добровольного потребления алкоголя у лабораторных крыс [3, 4]. АльДГ также защищает мозг от проникновения высокотоксичного метаболита этанола—ацетальдегида [5].

Исследование проведено на крысах двух пар линий, выведенных в Исследовательских лабораториях Финской государственной монополии «АЛКО» специально для изучения генетических аспектов алкоголизма [2]. Линии AA и ANA—животные соответственно с высоким и низким уровнем добровольного потребления (предпочтения) этанола; линии AT и ANT—животные соответственно с высокой и низкой поведенческой устойчивостью к токсическому действию этанола. Для исследования АльДГ мозга взято по 7 крыс-самцов каждой линии. Животных декапитировали, кусочки конечного мозга, гипоталамуса, мозжечка, моста и шейного отдела спинного мозга замораживали в жидком азоте. Криостатные срезы обрабатывали на выявление активности АльДГ по методу, описанному нами ранее [6]. В качестве субстратов использовали уксусный (алифатический) и бензойный (ароматический) альдегиды в конечной концентрации в инкубационной среде 20 мМ. Интенсивность окраски, пропорциональную активности фермента в структурах измеряли цитоспектрофотометрически с помощью сканирующего микроскопа-фотометра (МЦФУ-2 МП, ЛОМО) при длине волны 580 нм. Среди структур одного типа у каждого животного проводили не менее 20 измерений; полу-

ченные средние значения обрабатывали статистически с использованием критерия Стьюдента.

У животных линии АА, по сравнению с крысами АНА, выявлена пониженная активность АльДГ с ацетальдегидом в качестве субстрата (АльДГ А) в нейропиле коры обонятельных бугорков и повышенная активность АльДГ с бензальдегидом (АльДГ Б) в мотонейронах спинного мозга и клетках Пуркинье мозжечка (рисунок). У крыс линии АТ, по сравнению с АНТ, отмечено небольшое повышение активности АльДГ А

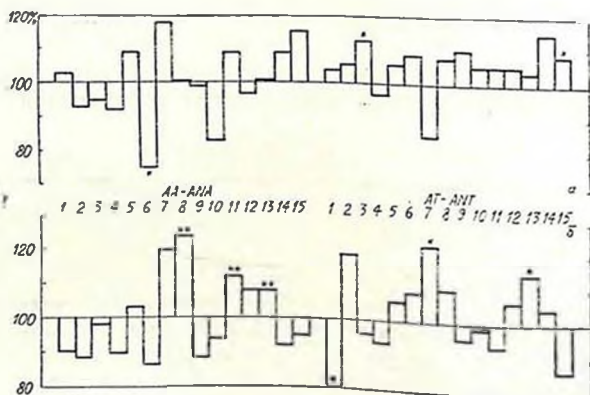


Рис. Активность альдегиддегидрогеназы в структурах мозга крыс линий АА и АТ в % по отношению к животным линии АНА и АНТ (а—субстрат ацетальдегид, б—бензальдегид). 1—нейроны ганглиозного слоя сенсомоторной коры мозга; 2—капилляры коры мозга; 3—наружный зернистый слой коры мозга; 4—латеральная паракортикальная область; 5—полосатое тело; 6—кора обонятельных бугорков; 7—нейроны аркуатного ядра гипоталамуса; 8—мотонейроны спинного мозга; 9—глициты спинного мозга; 10—нейропил 1—II зоны спинного мозга; 11—клетки Пуркинье мозжечка; 12—нейроны зернистого слоя мозжечка; 13—капилляры мозжечка; 14—нейроны мезенцефального тракта тройничного нерва; 15—нейроны латерального гипоталамуса. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

почти во всех исследованных структурах ЦНС (достоверно—в наружном зернистом слое коры мозга и нейронах латерального гипоталамуса). Лишь в перикарионах нейроцитов аркуатного ядра гипоталамуса активность АльДГ имела тенденцию к снижению. Активность АльДГ Б у крыс линии АТ значительно снижена в нейронах ганглиозного слоя коры мозга и повышена в нейронах аркуатного ядра и эндотелии кровеносных капилляров мозжечка (рисунок).

Учитывая данные о повышенном содержании дофамина в мозгу животных линии АА [7], можно предположить, что пониженная активность АльДГ в обонятельных бугорках будет в условиях потребления алкоголя способствовать здесь большому накоплению ацетальдегида, а следова-

тельно, и продукта его конденсации с дофамином—сальсолинола, играющего важную роль в механизмах влечения к алкоголю [8]. Выявленное небольшое увеличение активности АльДГ А почти во всех изученных структурах ЦНС крыс линии АТ, по сравнению с животными АНТ, может иметь отношение к повышенной устойчивости крыс к этанолу. Известно, что ацетальдегид, образующийся при окислении этанола на периферии, в значительной степени опосредует его нейротропные эффекты [8]. В этом случае даже незначительные различия активности АльДГ в ряду эндотелий капилляров—глиоциты—нейроциты могут сузиться при диффузии ацетальдегида из крови в цитоплазму нейронов. Обнаруженные в некоторых структурах мозга противоположно направленные различия в активности АльДГ при использовании в качестве субстрата уксусного и бензойного альдегидов указывают на существование линейных различий в субстратной специфичности АльДГ.

Таким образом, установлены генетически обусловленные локальные различия по АльДГ мозга, которые могут быть связаны с различным отношением крыс к алкоголю.

ALDEHYDE-DEHYDROGENASE FROM VARIOUS BRAIN REGIONS OF RATS DIFFERING IN PREFERENCE OR TOLERANCE TO ALCOHOL

S. M. ZIMATKIN, *K. O. LINDROS

Institute Biochemistry, Academy of Sciences of the Belorussian SSR, Grodno.
*Research Laboratories of the Finnish State Alcohol Monopoly "ALCO",
Helsinki

We studied the activity of aldehyde-dehydrogenase (AldDH, EC 1.2.1.3) by quantitative histochemistry in 15 functionally different CNS regions in two rat strains selected for differences in alcohol-associated behaviour. In animals of strain AA with high preference to alcohol the activity of AldDH was decreased in neuropile of the olfactory tubercles cortex and the decreased activity was also found in motoneurons of the spinal cord, Purkinje cells and endothelium of cerebellum capillaries as compared with the rats of ANA strains «rejecting» ethyl alcohol. In AT rats resistant to the toxic effect of alcohol some increase in the activity of AldDH (acetaldehyde as a substrate) was found in the majority of studied brain regions; activity of AldDH with benzaldehyde as a substrate was increased in neurocytes of the arcuate hypothalamic nucleus and cerebellar capillaries and in neurocytes of the ganglionic layer of the cerebral cortex as compared with rats of ANT strain sensitive to the toxic effect of ethyl alcohol. The contribution of AldDH to the mechanism of genetically different attitude of animals to alcohol is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Saunders J. B., Williams R. Alcohol and Alcoholism, v. 12, p. 169—217, 1983.
2. Eriksson K., Ruzi M.—In: Development of Animal Models as Pharmacogenetic Tools (eds. C. E. McClure, R. A. Oetrich, V. G. Erwin), p. 87—117, Rockville, Md., 1981.
3. Amir S. Psychopharmacology, v. 57, p. 97—102, 1978.
4. Socaransky S. M., Aragon C. M. G., Amit Z. Alcohol, v. 2, p. 361—365, 1985.
5. Petterson H. Acta Univ. Upsala: Abstra Upsala Diss. Fac. Sci., № 621, p. 1—38, 1981.
6. Зымакин С. М., Сатановская В. Н., Островский Ю. М. Докл. АН. БССР. т. 30, с. 368—371, 1986.
7. Kilianac K. Acta Pharmacol. Toxicol., suppl. 1, abs. 14, 1984.
8. Topel H. Alcohol, v. 2, p. 711—788, 1985.

Поступила 28. VI 1988

Трансмиттерные молекулы мозга и гипофиза. E. E. Müller G. Nistico. Academic Press, Лондон, Англия, 1988 г.

Brain Transmitter Molecules and the Pituitary Gland. E. E. Müller, G. Nistico, Academic Press, London, England, 1988.

В книге суммированы результаты фундаментальных и клинических исследований по нейропептидам, нейротрансмиттерам, осуществляемому ими контролю над гормонами передней доли гипофиза, прослежены нарушения в их функциональной активности, приводящие к нейроэндокринным расстройствам. Авторы указывают на сложность механизмов, контролирующих нейроэндокринную функцию и на многообразие путей, которыми различные мессенджеры (нейротрансмиттеры, нейрогормоны и нейромодуляторы) взаимодействуют друг с другом. Предлагается также концепция, согласно которой некоторые нейроэндокринные расстройства могут быть отнесены к первичной дисфункции нейротрансмиттеров. Содержание отдельных глав: Химические трансмиттеры мозга. Нейротрансмиттеры, нейромодуляторы и нейромедиаторы. Гипофизотропные регуляторы передней доли гипофиза. Передний гипофиз: мишень для воздействия нейрогормонов-нейротрансмиттеров ЦНС и периферических гормонов. Регуляция нейротрансмиттерами передней доли гипофиза. Вовлечение нейротрансмиттеров-нейропептидов в нейроэндокринные расстройства: диагностические и терапевтические показания.



ОБЗОРЫ

УДК 577.15.547.466:612.82

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГАМК-ШУНТА
В ГОЛОВНОМ МОЗГУ

РОЗАНОВ В. А.

Медицинский институт им. Н. И. Пирогова, Одесса

В обзоре рассмотрены основные экспериментальные данные, касающиеся возможных механизмов регуляции потока через ГАМК-шунт в нервной ткани на уровне метаболического контроля, проанализированы результаты исследований, оценивающих количественный вклад ГАМК-шунта в энергетический метаболизм в головном мозгу. Предложена схема регуляции ГАМК-шунта, основанная на представлении о ключевой роли функциональной активности ГАМК-ергических нейронов и изменениях концентрации K^+ и Ca^{2+} в межклеточном пространстве.

ГАМК-шунт рассматривается как совокупность нейроспецифических реакций, являющихся обходным метаболическим путем по отношению к стадии окисления α -кетоглутарата и обеспечивающих повышенные компенсаторные возможности нервной ткани при экстремальных состояниях [1] и защиту мозга от стрессовых повреждений [2]. В связи с этим представляет большой интерес вопрос о закономерностях регуляции этого пути метаболизма в ЦНС.

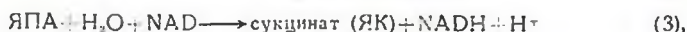
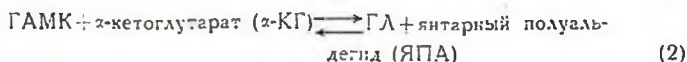
В настоящем обзоре рассматривается круг вопросов, связанных с быстрыми механизмами регуляции ГАМК-шунта на уровне метаболического контроля, и не затрагиваются более высокие уровни регуляции, а также другие метаболические превращения ГАМК и глутамата, подробно рассмотренные в ряде монографий и обзоров [5—9].

Идентификация регуляторных ферментов, изучение их свойств *in vitro* и доказательства наличия «структуры» у ГАМК-шунта как пути метаболизма

Теоретические исследования Newsholme показали, что метаболические пути обладают термодинамической и кинетической структурой, которая отражает устойчивость метаболического потока и возможности его регуляции [3, 4]. Последовательность реакций лишь тогда является метаболическим путем, когда доказана его общая термодинамическая вы-

годность и наличие потокообразующей, околоравновесной(ых) и неравновесной(ых) стадий [4].

ГАМК-шунт представляет собой последовательность реакций:



что можно представить в виде следующего суммарного уравнения:



Таким образом, общим итогом работы ГАМК-шунта является окислительное декарбоксилирование α -КГ, но без участия CoASH и фосфорилирования ГТФ [5, 7].

Исходя из значений стандартной свободной энергии окисления в присутствии NAD^+ ($\Delta G'_{ox}$) с учетом энергии, выделяющейся при окислении NADH в дыхательной цепи, значение стандартной свободной энергии (ΔG°) для суммарного процесса составляет $-151.4 \text{ кДж моль}^{-1}$, что указывает на экзергонический характер ГАМК-шунта*. Таким образом, ГАМК-шунт как метаболический путь представляет собой неравновесный процесс, причем наиболее далека от равновесия его первая стадия — глутаматдекарбоксилазная (ГДК) реакция, которая является необратимой и протекает с выделением CO_2 . Это обстоятельство, а также сравнительно низкая величина V ГДК-реакции по сравнению с ГАМК-трансаминазой в ткани мозга [9, 10] однозначно указывают на то, что ГДК является регуляторным ферментом ГАМК-шунта, его потокообразующей стадией. Более того, максимальная активность каждого последующего фермента ГАМК-шунта больше, чем активность предыдущего: ГАМК-Т-активность превышает ГДК-активность в 4—5 раз [9, 10], а активность дегидрогеназы ЯПА в 2 раза выше максимальной ГАМК-Т-активности [11].

Некоторые молекулярные и кинетические характеристики ГДК из головного мозга животных представлены в табл. 1. Очищенная ГДК инактивируется при добавлении макроэргических трифосфатов, особенно АТР (в концентрациях, ниже физиологических). Этот эффект ослабляется при повышении концентрации в среде P_i и пиридоксаль-5-фосфата (PLP); механизм ингибирующего влияния АТР заключается в снижении степени насыщения апофермента кофактором [16]. Специальные эксперименты указывают на то, что АТР и PLP не конкурируют за один и тот же участок поверхности фермента, участок связывания АТР не входит в состав активного центра ГДК [17]. Таким образом, АТР выступает как аллостерический регулятор ГДК, снижающий сродство апофермента к коферменту.

* Исходные данные для расчета взяты из руководства: Мецлер Д., Биохимия, т. 1, табл. 3.3 и 3.7, М., Мир, 1980.

Таблица 1

Некоторые молекулярные и кинетические характеристики ГДК из головного
мозга млекопитающих

Источник	Величина M_r	Субъединичная структура	Кинетические характеристики	Число оборотов или величина У. А.	Ссылка
Мышь	85 ± 2 кД	Две идентичные субъединицы с $M_r 44 \pm 2$ кД	K_m для ГА=0,7 мМ K_m для PLP=0,05 мкМ	3,3 моль ГАМК· ·мг ⁻¹ ·мин ⁻¹ 1,1 - 1,6с ⁻¹ *	[14] [9, 15]
Свинья (обнаружены 3 формы ГДК ГДК-I, II и III)	120 кД	Две идентичные субъединицы с $M_r 60$ кД	ГДК-I K_m для ГА=0,17 мМ K_i для ГАМК=11,1 мМ K_D для PLP=0,18 мкМ ГДК-II K_m для ГА=0,45 мМ K_i для ГАМК=19,8 мМ K_D для PLP=0,35 мкМ ГДК-III K_m для ГА=1,24 мМ K_i для ГАМК=23,9 мМ K_D для PLP=0,76 мкМ	—	[12]
Человек	140 кД	Две идентичные субъединицы с $M_r 67$ кД	K_m для ГА=1,3 мМ K_m для PLP=0,13 мкМ	—	[13]

*Расчет произведен нами на основании данных работ Shank, Cambell и Rando [9, 15].

В дальнейших экспериментах выяснилось, что АТР лишь усиливает ингибирующее влияние субстрата (ГЛ) на активность очищенной ГДК. Добавление 10 мМ ГЛ вызывает диссоциацию холофермента, сопровождающуюся двухфазным снижением активности (с быстрым и медленным компонентом), этот эффект усиливается в присутствии микромолярных концентраций АТР и P_i , но ослабляется при добавлении 10 мМ PLP. При изучении восстановления холоэнзима из PLP (20 мкМ) и апоэнзима (полученного инкубацией холоэнзима с ГЛ), выяснилось, что полного восстановления холоэнзима даже при насыщающих концентрациях PLP достигнуть не удастся [18, 19]. Однако, если в процессе предварительного получения апоГДК инкубация с ГЛ осуществляется в присутствии < 100 мкМ АТР, последующая реактивация в присутствии PLP протекает быстрее. Добавление АТР в концентрациях больших, чем 100 мкМ, ингибирует этот процесс: добавление P_i (1—10 мМ) стимулирует реактивацию [18].

Согласно последним данным, ГДК головного мозга помимо декарбоксилирования ГЛ, способна осуществлять зависимую от декарбоксилирования реакцию переаминирования L-глутамата, в результате которой получается CO_2 , пиридоксаминфосфат и ЯПА [20]. Кроме того, ГДК может осуществлять переаминирование ГАМК с PLP с образованием ЯПА и пиридоксамин-5-фосфата. В обоих случаях при этом ГДК теряет кофермент и превращается в апоформу. Интенсивность этих процессов составляет доли процента от интенсивности декарбоксилирования ГЛ, они активируются при сдвиге pH в щелочную сторону, в то время как оптимум pH ГДК-реакции лежит в пределах 6,2—6,5 [20].

В последние годы описаны изоферменты ГДК (α , β и γ -формы), отличающиеся по кинетическим характеристикам [12, 20], но, по-видимому, имеющие близкую величину M_r [20]. Изоформы ГДК отличаются различной чувствительностью к ингибирующему действию АТР [21]. В мозгу различают также PLP-зависимую и PLP-независимую (то есть прочно связанную с PLP) ГДК [7, 12]. Активность PLP-независимой ГДК составляет 25% от суммарной, остальная принадлежит PLP-зависимой ГДК [7]. Неясно, являются ли они самостоятельными типами ГДК, или же обусловлены наличием двух каталитических центров или двух субъединиц одной и той же молекулы фермента [7]. Кроме того, различают цитоплазматическую ГДК-I и митохондриальную ГДК-II [8].

В целом представленные данные дают основание утверждать, что доступность кофактора (PLP) является важным моментом в регуляции ГДК-активности *in vitro*. Сравнительно низкие значения K_m для ГЛ при том, что содержание ГЛ в мозгу доходит до 10 ммоль/кг, а концентрация ее внутри клеток может быть значительно больше, свидетельствуют о том, что ГДК-реакция близка к насыщению субстратом. При этом повышение концентрации ГЛ, в силу приведенного выше механизма, приводит к снижению ГДК-активности и уменьшению потока через ГАМК-шунт, что полностью удовлетворяет требованиям [4], предъявляемым к потокообразующей стадии метаболического пути.

Имеются данные о том, что очищенная ГДК ингибируется не только

ГЛ, но и конкурентно подавляется продуктом реакции—ГАМК ($K_i = 16$ мМ); этот процесс также зависит от АТР, в его основе лежит диссоциация—ассоциация холофермента [22]. ЯПА, глиоксилат, пируват, оксалоацетат и α -КГ в микромолярных концентрациях активируют ГДК, а глутарат и α -КГ в миллимолярных концентрациях ингибируют фермент [23]. Отмечено также, что очищенная ГДК подавляется норадреналином и серотином в миллимолярных концентрациях [23]. Имеются данные, что Cl^- (200 мМ) и Zn^{2+} (10 мкМ) обладают угнетающим действием на ГДК-активность *in vitro* [15, 23], причем влияние Cl^- в одинаковой степени сказывается на всех изоформах ГДК [21].

Вторая стадия ГАМК-шунта (ГАМК-трансаминазная реакция), учитывая ее обратимый характер [24], по всей видимости, является равновесной и зависит от концентрации субстратов и продуктов реакции. Эту стадию катализирует ГАМК-Т, представляющая собой димер из двух, по-видимому, идентичных субъединиц по 50—58 кД в зависимости от источника выделения (табл. 2). Довольно большие значения K_m для α -КГ и ГАМК и данные о сравнительно высокой максимальной ГАМК-Т-активности в ткани мозга свидетельствуют о том, что доступность субстратов является основным фактором, определяющим интенсивность пересаминирования в ГАМК-Т-реакции.

Третью стадию ГАМК-шунта (окисление ЯПА в ЯК) катализирует ЯПАДГ, присутствующая в мозгу человека в двух изоформах, заметно отличающихся по аминокислотному составу, но имеющих близкую величину M_r (145 кД) и являющихся димерами ($M_r \approx 69$ кД) [32]. K_m для NAD (в зависимости от изоформы и источника выделения) колеблется в пределах 16,0—30,0 мкМ, для ЯПА—2,0—3,7 мкМ [32, 33]. Высокие концентрации ЯПА (> 100 мкМ) ингибируют ЯПАДГ из мозга крысы по неконкурентному типу по отношению к NAD, в механизме катализа имеет место упорядоченный тип связывания субстратов: NAD присоединяется первым и NADH отщепляется последним [33]. Сведения о возможности обратной ЯПАДГ реакции в литературе нами не обнаружены. Можно полагать, что интенсивность этой реакции ГАМК-шунта зависит от восстановления пиридиннуклеотидов. Равновесие в ЯПАДГ-реакции сдвинуто вправо вследствие быстрой утилизации ЯК, в связи с чем данную реакцию можно считать практически необратимой [34]. Согласно расчетам [34], содержание ЯПА в головном мозгу по меньшей мере на 3 порядка ниже, чем ГАМК и ГЛ; за ЯПА помимо ЯПАДГ konkurрируют активные ЯПА-редуктазные системы [35]. Эти данные дают основание заключить, что ЯПАДГ-реакция представляет собой неравновесную стадию ГАМК-шунта, которая не насыщается субстратом.

Таким образом, ГАМК-шунт удовлетворяет требованиям, предъявляемым к метаболическим путям [4], поскольку включает неравновесную потокообразующую стадию, близкую к насыщению субстратом (ГДК-реакция); неравновесную стадию, не насыщаемую субстратом (ЯПАДГ-реакция) и околоравновесную обратимую стадию (ГАМК-Т-реакция) и в целом является неравновесным энергетически выгодным процессом.

Таблица 2

Некоторые молекулярные и кинетические характеристики очищенной до гомогенного состояния ГАМК-Г из головного мозга млекопитающих

Источник	Величина M_r	Субъединичная структура	Кинетические характеристики	Число оборотов или величина U . А.	Ссылка
Кролик	116 кД	Две идентичные субъединицы с M_r 58 кД	—	9,5 сек ⁻¹	[25]
Мышь	109 кД	Две неидентичные субъединицы с M_r 53 и 58 кД	K_m для ГАМК=1,1 мМ K_m для α -КГ=0,25 мМ	50 мкмоль ГЛ мг ⁻¹ мин ⁻¹	[14]
Крыса	104 $\pm$ 6 кД	Две идентичные субъединицы с M_r 57 $\pm$ 5 кД	K_m для α -КГ=5,5 мМ	3,5–30,6 с ⁻¹	[26] [27]
Свинья	100 кД	Две идентичные субъединицы с M_r 50 кД	—	9,6 с ⁻¹	[28]
Свинья (обнаружены 2 формы ГАМК-Т а и в)	110 кД		Форма а. K_m для α -КГ=1,3 мМ Форма в. K_m для α -КГ=0,4 мМ	8,3 мкмоль ГЛ мг ⁻¹ мин ⁻¹ 2,9 мкмоль ГЛ мг ⁻¹ мин ⁻¹	[31]
Человек	—	Две идентичные субъединицы с M_r 50 кД	—	—	[29]
Человек	—	—	K_m для ГАМК=0,4 мМ K_m для α -КГ=1 мМ	—	[30]

Анализ регуляторных эффектов в системе метаболизма ГАМК в головном мозгу

Необходимо отметить, что вопрос о соотношениях и механизмах регуляции *in vivo* альтернативных путей обмена глутамата, куда входит и глутаматдекарбоксилазный путь, неоднократно обсуждался [5, 7, 9, 36]. Известно, что основным путем преобразования глутамата является аминотрансферазный, в то время как декарбоксилазный представлен значительно слабее. Это вытекает из сопоставления максимальных активностей соответствующих ферментов. Однако интенсивность декарбоксилирования глутамата может возрасти при подкислении внутренней среды клеток, поскольку оптимум pH ГДК лежит в пределах 6,2—6,5 [5, 7, 37]. В настоящем разделе мы рассмотрим только экспериментальные данные, имеющие отношение к построению теории метаболического контроля ГАМК-шунта как единого метаболического пути в нервной ткани.

Возможность переноса результатов, полученных на очищенных препаратах ферментов, на механизмы регуляции *in vivo* представляет большую проблему. Однако в случае с ГДК ряд регуляторных эффектов находит свое подтверждение при исследовании ферментативной активности в гомогенатах ткани мозга.

При изучении препаратов нервной ткани подтверждается, что ГДК работает в условиях неполного насыщения PLP: степень насыщения фермента коферментом колеблется от 10 до 60% в различных отделах мозга [38]. Максимальная активность апофермента ГДК наблюдалась в черной субстанции, там же отмечалась минимальная доля холофермента и наиболее выражено проявлялось ингибирующее действие метоксипиридоксина [38]. Таким образом, *in vivo* доступность кофактора является основным компонентом метаболического контроля ГДК-активности. Выявлена прямая зависимость в распределении ГДК-активности и активности пиридоксалькиназы между отделами мозга, причем активность пиридоксалькиназы отчетливо подавляется 1 мМ ГАМК [39], вследствие чего замыкается регуляторный механизм по принципу обратной связи, то есть реализуется торможение продуктом реакции, но через дополнительный механизм, включающий доступность кофактора. В грубых гомогенатах и в культуре клеток сетчатки подтверждается ингибирующая роль ГАМК как продукта реакции [40]. Исключением из выявленной закономерности является мозжечок: здесь высокая активность пиридоксалькиназы сочетается с относительно небольшой ГДК-активностью [39].

При изучении регуляции уровня ГАМК в структурах лимбической системы мозга крыс показано тормозящее влияние 0,3—2,0 мМ АТР на ГДК-активность, причем одновременно выявлена способность ГАМК (10^{-2} М) тормозить олигомицинзависимую АТРаду [41]. На основании собственных данных и анализа литературы предложена схема регуляции обмена ГАМК в синаптическом окончании (рис. 1), которая предусматривает наличие периодических колебаний величины соотношения

ГЛ/ГАМК, что может иметь значение для переключения процессов возбуждения и торможения в ЦНС [41].

В наших экспериментах активность PLP-независимой ГДК была наибольшей в мозжечке (вдвое выше, чем в коре больших полушарий и стволовой части мозга) [42]. PLP-зависимая ГДК также была наиболее активна в мозжечке, а максимальная ГДК-активность (содержание фермента) в мозжечке и стволе была примерно одинакова и превышала таковую в коре мозга. В то же время, отношение ГЛ/ГАМК в мозжечке и

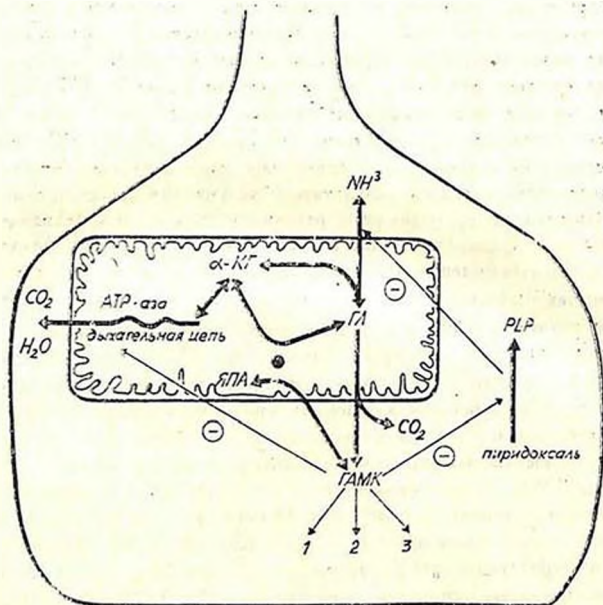


Рис. 1 Схема регуляции обмена ГАМК в синаптическом окончании [41].

Предполагается, что общий фонд ГАМК подразделяется на медиаторную (1), немедиаторную (2) и регуляторную (3) ГАМК. Повышение уровня регуляторной ГАМК приводит к снижению концентрации PLP за счет торможения пиридоксалькиназы и прямого выключения PLP из катализа путем образования шиффового основания с ГАМК. Одновременно происходит повышение глутаматдегидрогеназной активности (вследствие снятия тормозящего влияния PLP) и торможение АТФазной активности. В итоге накапливается α -КГ, что создает условия для восстановления уровня ГЛ и увеличения соотношения ГЛ/ГАМК

коре было практически одинаковым, следовательно, выявляемые различия в ГДК-активности в этих двух отделах мозга не связаны и не зависят от соотношения ГЛ/ГАМК. Таким образом, различия в ГДК-активности разных отделов мозга скорее всего обусловлены различиями в содержании ГДК (или в доле ГАМК-ергических нейронов), чем особенно

стями регуляции ГДК в этих отделах [42]. Аналогичный вывод можно также сделать на основании того, что в разных отделах мозга показаны отличия в 2—2.5 раза в содержании апо-ГДК [43].

Представляют интерес данные об активирующем влиянии деполяризующих концентраций K^+ на активность ГДК, эффект смещен на препаратах синапсом и на срезах мозга, он зависит от наличия в среде Ca^{2+} [44]. Эти данные указывают на то, что активирующее влияние K^+ связано с выбросом ГАМК из нервных структур в ответ на деполяризацию, что приводит к снятию ретронгибирования ГДК и активации продукции ГАМК. Вероятно, этот эффект имеет большое регуляторное значение *in vivo*.

Относительно возможных механизмов регуляции потока через ГАМК-Т-реакцию можно отметить следующее. Равновесие в этой реакции при исследовании гомогенатов мозга смещено влево, в сторону образования ГАМК [24]. По нашим данным, внутри митохондрий, где сконцентрировано 80% ГАМК-Т-активности, отношение ГЛ/ГАМК приближается к 1, в то время как вне митохондрий оно равно 3 [45]. Вероятнее всего, в митохондриях, где образующийся ЯПА быстро утилизируется под действием ЯПАДГ, а ГЛ также быстро включается в ЦТК на стадии α -КГ, равновесие в ГАМК-Т-реакции сдвинуто вправо, а в цитоплазме—влево.

Относительно ЯПАДГ-реакции теоретически предсказывается ее практически необратимый характер в связи с быстрой утилизацией образующегося сукцината [34].

Динамическая компартментализация обмена ГАМК.

Транспорт через биомембраны как фактор регуляции обмена ГАМК

Проблеме компартментализации энергетического и аминокислотного обмена, в том числе обмена ГАМК в ЦНС, посвящены монографии и обзоры [5, 7, 9]. С понятием компартментализации тесно связано представление о так называемых связанных и свободных формах ГАМК и глутамата, отражающих их статическое распределение в нервной ткани [46—48] и о множественности метаболических путей этих аминокислот, отличающихся различной скоростью их метаболизма [9, 36]. Согласно современным представлениям, в нервной ткани различают два основных метаболических компартмента: большой (нейрональный, или энергетический) и малый (глиальный, или синтетический) [5]. Синаптические окончания выделяют в самостоятельный компартмент [49]. Известно, что ГДК локализована преимущественно в ГАМК-ергических нервных окончаниях, однако она содержится и в телах нейронов, и в глиальных клетках [5, 8, 50]. Сведения о нейроглиальном распределении ГАМК-Т-активности противоречивы. Согласно данным ряда авторов, ГАМК-Т в клетках глии более активна, чем в нейронах [51], по другим данным, вклад глиальных клеток в деградацию ГАМК незначителен [52]. В то же время очевидно, что основная масса ГАМК-Т (80%) локализована в постсинаптической зоне [52] и в несинапсомных митохондриях, отли-

чающихся также и более высокой активностью синаптически-восстановительных ферментов [36]. Имеются данные в пользу того, что транспорт ГАМК внутрь митохондрий осуществляется специфическим переносчиком в обмен на ГА [53].

Основная концепция, характеризующая взаимосвязь различных компартментов обмена ГАМК, сводится к следующему. В малом (глиальном) компартменте поглощаемая глйей ГАМК трансформируется в глутамин, который мигрирует в нейроны (нервные окончания), где является предшественником ГА и ГАМК [7, 36]. В процессе метаболического обмена между нейронами и глйей происходит суммарное расщепление интермедиатов ЦТК от нейрона к глйальной клетке. Глутамин и оксалоацетат глйального происхождения, образующийся в пируваткарбоксилазной реакции, частично восполняют эти потери [54]. Эти положения подкрепляются сведениями о наличии систем активного транспорта нейромедиаторных аминокислот внутрь нейронов и глиоцитов [7, 8], а также данными о существовании систем активного транспорта α -КГ и малата в мембранах нервных клеток [55]. Как и для аминокислот, этот процесс зависит от наличия Na^+ в среде, скорость поглощения α -КГ тормозится глутаматом, аспартатом и пируватом; глутамин, ГАМК и β -аланин стимулируют поглощение α -КГ синаптическими [55].

На основании этих положений и приведенных в предыдущих разделах данных можно попытаться представить себе интегральную схему регулируемых событий, определяющих интенсивность обмена ГАМК (рис. 2). Исходя из того, что осуществление пре- и постсинаптического торможения является основной физиологической функцией ГАМК-ергических нейронов, логично предположить, что именно приход нервного импульса или повышение концентрации K^+ во внеклеточной среде (при деполяризации близлежащих нервных клеток) является пусковым механизмом не только нейрофизиологических, но и метаболических сдвигов в системе ГАМК.

Представленная на рис. 2 схема подкрепляется данными о том, что синаптический компартмент содержит не более 10—20% от общего содержания ГАМК в нервной ткани [56], вследствие чего выход ГАМК из синаптических окончаний существенно сказывается на содержании ГАМК в нервных окончаниях, что может иметь регуляторное значение. Дебавление ГАМК к культуре астроцитов дозозависимо стимулирует активность глйальной ГАМК-Т [51]. ГАМК активно поглощается астроцитами против градиента концентрации, причем увеличение дозы ГАМК стимулирует ее поглощение по механизму положительной обратной связи: спонтанный выход ГАМК из астроцитов, в противоположность поглощению, не изменяется при повышении концентрации ГАМК в среде [57]. Основная масса выделяемого нейронами ГА поглощается астроцитами, где он претерпевает метаболические превращения до α -КГ и глутамина, последние транспортируются обратно в нейроны и синаптические окончания; подчеркивается, что в ГАМК-ергических нейронах основная масса ГА используется для образования ГАМК [58].

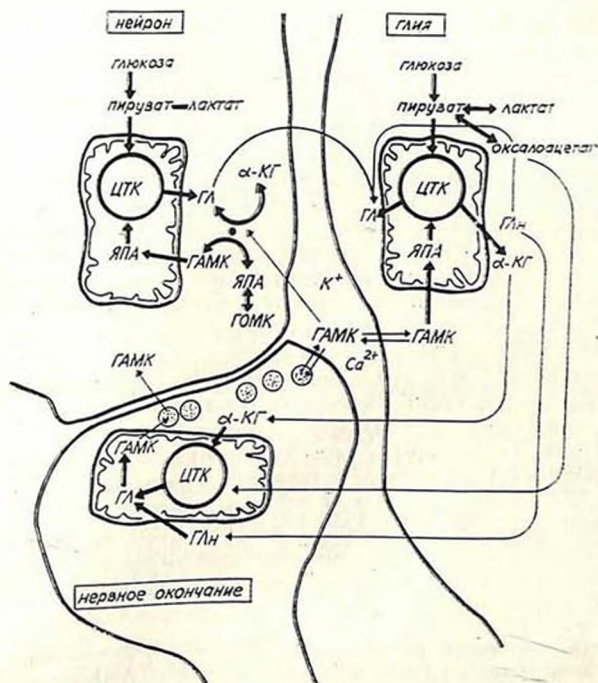


Рис. 2 Схема регулируемых процессов при работе ГАМК-шунта с учетом компартиментализации его компонентов (для ГАМК-ергических нейронов).

Приход нервного импульса или увеличение внеклеточной концентрации K^+ (в присутствии Ca^{2+}) вызывает выброс ГАМК из нервных окончаний и клеток глии. Снижение концентрации ГАМК в пресинаптическом компартменте влечет за собой снятие ретроингибирования ГДК и тормозящего влияния ГАМК на глиридоксалькиназу. За этим следует активация ГДК и уменьшение пресинаптического фонда ГЛ. В постсинаптических структурах поглощение ГАМК приводит к уменьшению отношения ГЛ/ГАМК, вследствие чего в цитоплазме тормозится обратная ГАМК-Т-реакция. Благодаря сопряженному переносу ГАМК внутрь митохондрий, а ГЛ — наружу, ГАМК включается в ЦТК на стадии сукцината, восстанавливается митохондриальное соотношение ГЛ/ГАМК и избыток ГЛ мигрирует в клетки глии, где он служит сырьем для синтеза новых порций ГАМК и глутамина (ГЛН). ГАМК в клетках глии включается в ЦТК на стадии сукцината, вследствие чего создаются условия для оттока α -КГ, оксалоацетата и глутаминна в нервные окончания. Там эти субстраты служат для восполнения потерь субстратов ЦТК, отвлекаемых для образования ГЛ и ГАМК.

Предложенная схема предусматривает пространственную разобщенность ГАМК-шунта (по крайней мере его потокообразующей стадии — ГДК-реакции) от двух последующих и указывает на наличие диспетчерских транспортных стадий: стадии выхода ГАМК из нервных окончаний или глиальных клеток, транспорта внутрь нейронов, нервных окончаний и глии, транспорта внутрь митохондрий. На каждой из этих стадий может осуществляться регуляция потока через ГАМК-шунт. Учитывая квантовость выброса ГАМК из нервных окончаний и сравнительно низкий уровень спонтанного выхода ГАМК из глии и нейронов, резко стимулируемый K^+ и зависящий от Ca^{2+} [7, 58], эта стадия может играть роль дополнительной потокообразующей ступени, близкой к насыщению субстратом. Учитывая то, что поглощение ГАМК срезами мозга с последовательным включением систем высокого и низкого сродства характеризуется отсутствием насыщения (в пределах физиологических концентраций ГАМК) [59, 60], можно полагать, что поступление ГАМК внутрь клеток является стадией, далекой от насыщения и зависящей от концентрации внеклеточной ГАМК. Наконец, учитывая то, что транспорт ГАМК внутрь митохондрий осуществляется, вероятно, в обмен на ГЛ, можно предполагать, что этот процесс также прежде всего зависит от концентрации ГАМК и ГЛ вне и внутри митохондрий. В то же время следует отметить, что существуют популяции нейронов, содержащих все компоненты ГАМК-шунта (ГДК, ГАМК-Т и ЯПАДГ [61]) и, следовательно, не зависящие от транспорта ГАМК через биомембраны. Это подчеркивает разнообразие регуляторных механизмов ГАМК-шунта в ЦНС в силу ее клеточной гетерогенности.

Количественная характеристика потоков и ферментативных активностей в ГАМК-шунте. Оценка вклада ГАМК-шунта в биоэнергетику. Взаиморегуляции между α -КГДК-реакцией и ГАМК-шунтом.

Поскольку, как уже указывалось, основным итогом реакций ГАМК-шунта является утилизация α -КГ, представляет большой интерес вопрос о доле α -КГ, проходящей через ГАМК-шунт, то есть о количественном вкладе ГАМК-шунта в цикл Кребса. Использование различных методических подходов дает разные результаты. По данным математического моделирования, ГАМК-шунт составляет от 20 до 34% потока через цикл Кребса [34]. Сравнение максимальных ферментативных активностей, ответственных за работу ЦТК и ГАМК-шунта, по данным разных авторов, дает значения от 10 до 40% [62—64]. Используя методику оценки вклада ГАМК-шунта в поток субстратов ЦТК по измерению включения метки в ГАМК из меченого пирувата McKhann и соавт. [64] получили значение в пределах 40%. С учетом возможной компартментализации пула глутамата, применяя метод радионуклидной индикации в сочетании с математическим моделированием, Balazs и соавт. показали, что ГАМК-шунт в мозгу может составлять не более 8—10% от общего потока через цикл Кребса [45]. Учитывая то, что ГАМК-ергические нейроны составляют

лишь часть от общей массы нейронов [9], в них эти величины могут быть значительно выше.

Представляет интерес сопоставление максимальных ферментативных активностей ГАМК-шунта и интенсивности потока его субстратов, особенно ГАМК, на различных этапах межклеточного транспорта в ЦНС. Значения ГАМК-Т-активности (табл. 3) колеблются примерно в тех же пределах, что и величины, характеризующие интенсивность поглощения ГАМК клеточными структурами. Следовательно, транспорт внутрь клеток не является лимитирующей стадией дальнейших метаболических превращений ГАМК. В то же время скорость ее спонтанного выхода из клеточных структур значительно ниже, чем скорость поглощения и ГАМК-Т-активность. Однако скорость выхода существенно увеличивается при повышении концентрации K^+ (в присутствии Ca^{2+}). Это еще раз подтверждает вероятность нашего предположения о том, что функциональная активность ГАМК-ергических нейронов является основным фактором регуляции ГАМК-шунта, а выход ГАМК—дополнительной потокообразующей стадией.

В связи с тем, что ГАМК-Т и α -КГДК непосредственно конкурируют за утилизацию α -КГ в митохондриях, напрашивается предположение о возможности взаиморегуляции между этими ферментными системами. К сожалению, сведения о механизмах регуляции α -КГДК головного мозга крайне ограничены. Регуляция по механизму фосфорилирования-дефосфорилирования для α -КГДК не доказана [72]. Очищенные препараты α -КГДК из мозга быка весьма нестабильны [74]. Ca^{2+} и Mg^{2+} и тиаминпирофосфат стабилизируют фермент. По всей видимости, Ca^{2+} имеет значение в регуляции α -КГДК-активности, так как он не только защищает фермент от инактивации, но и повышает его активность [74]. Эффект Ca^{2+} реализуется не через активацию киназы, как это характерно для ПДК, а посредством снижения K_m для α -КГ [71]. По некоторым данным, эффект Ca^{2+} может стать противоположным, ингибирующим, если его концентрация доходит до 100 мкМ [75]. Активность α -КГДК тормозится $NADH_2$, сукцинил-КоА и АТР, стимулируется АДФ, причем, по всей видимости, отношение $NADH_2/NAD^+$ и сукцинил-КоА/КоА имеет большее значение в регуляции, чем АТР/АДФ [71]. Таким образом, механизмы метаболического контроля, определяющие перераспределение потоков между ЦТК и ГАМК-шунтом, остаются неясными.

В то же время, хорошо известна взаимосвязь между функциональным состоянием ЦНС и интенсивностью реакций энергетического обмена. В связи с этим, функциональная активация ГАМК-системы, сопровождающаяся торможением в ЦНС и усилением утилизации ГАМК по пути ГАМК-шунта, хорошо согласуется с возможностью ослабления напряженности энергетического обмена в клетках, находящихся в состоянии торможения.

Таким образом, с учетом сопоставления интенсивности потоков и возможности взаиморегуляции между альтернативными путями обмена α -КГ теория метаболического контроля ГАМК-шунта в ЦНС может

Сравнение интенсивностей потоков субстратов и ферментативных активностей
ГАМК-шунта и некоторых сопряженных процессов (головной мозг
мелких грызунов)

Характеризуемый процесс	Параметр процесса	Численное значение* (мкмоль г ⁻¹ ткани мин ⁻¹)	Ссылка
Интенсивность утилизации глюкозы мозгом	V	1,22—4,0 ($K_m = 11,1$ мкМ)	[65, 66]
Интенсивность утилизации пирувата мозгом	V	0,68—2,28 ($K_m = 1,0—6,3$ мМ)	[67]
Поток активного ацетата через цикл Кребса	V_{Cp}	0,40	[49]
Поток субстратов через ГАМК-шунт	V_{Cp}	0,03—0,20	[49, 9]
Спонтанный выход ГАМК (область полосатого тела)	V_{Cp}	0,00003—0,0001	[73]
Спонтанный выход ГАМК из нейронов в культуре	V_{Cp}	0,01	[58]
Спонтанный выход ГАМК из глии в культуре	V_{Cp}	0,002—0,004	[58]
Спонтанный выход ГАМК из синапсов	V	0,02—0,01	[7]
В присутствии 60 мкМ/л K ⁺ , из срезов коры	V*	0,13	[68]
Поглощение ГАМК (срезы с низким средством)	V	0,115—0,300 ($K_m = 22,0$ мкМ)	[7]
Поглощение ГАМК низкоаффинное глией в культуре	V	0,124 ($K_m = 9,2—120,0$ мкМ)	[59]
Поглощение ГАМК высокоаффинное нейронами в культуре	V	0,584 ($K_m \approx 9,0$ мкМ)	[59]
Поглощение ГАМК высокоаффинное глией в культуре	V	0,013 ($K_m \approx 0,1—31,0$ мкМ)	[59, 9]
Обмен ГАМК между теоретическими компартментами	V_{Cp}	0,010—0,013	[34]
Поток глутамат→глутамин (культура астроцитов)	V_{Cp}	0,24	[70]
Поток глутамат→α-кетоглутарат (культура астроцитов)	V_{Cp}	0,41	[70]
Поглощение α-КГ синапсом (возбужден)	V	0,05—0,1 ($K_m = 10$ мкМ)	[55]
ГДК-активность (гомогенаты мозга и его отделов)	макс. актив.	0,09—0,12—0,28—0,45—0,7 ¹ —0,60	[38, 42, 10, 63, 65]
ГАМК-Т-активность (прямая: ГАМК→ЯПА)	макс. актив.	0,186—0,28—0,49—0,51—1,35	[45, 63, 72, 10, 71]
ГАМК-Т-активность (обратная: ЯПА→ГАМК)	макс. актив.	0,63—1,05	[23, 72]
α-КГ/ГДК-активность (гомогенаты или митохондрии)	макс. актив.	1,24—3,40	[45, 71]

* Все данные приведены к величинам в указанной размерности с учетом содержания в 1 г сырой ткани мозга 100 мг белка или 20 мг белка митохондрий, как рекомендовано в работе Hawking, Mans [71].

быть дополнена следующими соображениями. ГАМК выделяется медленно и спонтанно из всех типов клеток, однако ее выход из ГАМК-ергических нейронов носит дискретный характер и регулируется K^+ и Ca^{2+} . Захватывается и метаболизируется ГАМК, вероятно, всеми типами клеток, так как ГАМК-Т имеется как в ГАМК-ергических, так и в не содержащих ГАМК нейронах [76]. В последних повышение концентрации ГАМК стимулирует дополнительные возможности утилизации α -КГ по пути ГАМК-шунта. В литературе нет данных об изменении КГДК-активности при изменении концентрации K^+ , однако хорошо известно, что ПДК-активность в митохондриях нервной ткани под влиянием экзогенного K^+ резко увеличивается [77]. Можно думать, что это есть не что иное, как усиление потока на лимитирующей стадии ввода субстратов в ЦТК в связи с увеличением его пропускной способности вследствие активации ГАМК-шунта.

Множественность механизмов регуляции ГАМК-шунта

В последнее время все больше внимания уделяется надмолекулярной организации ферментов. Развито представление, согласно которому метаболический путь (фрагмент метаболизма) соответствует реально существующему мультиэнзимному комплексу [78]. В структуре гипотетических надмолекулярных комплексов, отражающих организацию ЦТК, находят свое место и ферментные системы альтернативных взаимосвязанных реакций, в частности аминотрансферазы: причем роль матрицы в формировании структуры играет α -кетоглутаратдегидрогеназный комплекс [79].

Для ферментов ГАМК-шунта фиксация на матрице и белок-белковые взаимодействия также играют большую роль в регуляции. Так, фиксация ГДК на синапсомембранных искусственных фосфолипидных мембранах имеет значение для регуляции ее активности. Связанная ГДК более восприимчива к регуляции кофактором и характеризуется более высокими значениями K_m по отношению к ГА, а также большей величиной V [80]. Два других фермента ГАМК-шунта (ГАМК-Т и ЯПАДГ), которые пространственно разобщены с ГДК, способны образовывать надмолекулярные комплексы [81, 82]. Величина M_r образующегося комплекса близка к 300 кД, отношение ГАМК-Т и ЯПАДГ в составе комплекса—1:1 с равновесной константой 0,1 мкМ [82].

Подводя итоги, можно отметить следующее. ГАМК-шунт в ЦНС представляет собой метаболический путь, обладающий термодинамической и кинетической структурой как единое целое, но пространственно разобщенный в силу компартментализации метаболизма ГАМК. Это не исключает возможности существования всех компонентов ГАМК-шунта в одном и том же нейроне, однако основной вклад в биоэнергетику ГАМК вносит, по-видимому, не там, где она синтезируется, а в постсинаптических образованиях. Анализ данных литературы указывает на весьма вероятную роль функциональной активности ГАМК-ергических нейронов и уровня K^+ (и Ca^{2+}) в межклеточной жидкости как основных регуляторов

интенсивности ГАМК-шунта. Биокатализаторы ГАМК-шунта представляют из себя олигомерные белки относительно небольшой величины M_r . Вероятнее всего они стерически связаны и пространственно сближены с более крупными и сложно организованными ферментами ЦТК, в частности с КГДК. Пока неизвестно, подвержены ли эти ферментные белки посттранскрипционной модификации (например, фосфорилированию-дефосфорилированию) и изменяется ли при этом их каталитическая активность, однако многочисленные данные свидетельствуют о регулирующем влиянии АТР на ГДК-активность. Наиболее вероятными лимитирующими стадиями ГАМК-шунта являются продукция ГАМК в ГДК-реакции и ее выход из пресинаптических образований, хотя не исключена регуляция доступностью субстрата и на последующих этапах ГАМК-шунта (ГАМК-трансаминазном и ЯПА-дегидрогеназном). Помимо срочных механизмов метаболического контроля, существуют, по-видимому, и долгосрочные: по механизму репрессии синтеза ГДК под действием ГАМК и по механизму индукции синтеза ГАМК-Т. Этот более высокий и эффективный уровень регуляции, связанный с изменением количества ферментов и индуцирующим влиянием гормональных факторов применительно к системе ГАМК представляет большой интерес, однако накопленный в этой области большой фактический материал может стать предметом самостоятельного аналитического обзора.

MECHANISMS OF REGULATION OF THE GABA SHUNT IN BRAIN

V. A. ROZANOV

Pirogov Medical Institute, Odessa

This review considers major experimental evidence related to possible mechanisms regulating the flow through the GABA shunt in nerve tissue at the level of metabolic control. Results of studies evaluating the quantitative contribution of the GABA shunt to energy metabolism of brain have been analysed. We propose a scheme for the regulation of GABA shunt which is based on the concept about the key role of the functional activity of GABA-ergic neurons and changes of K^+ and Ca^{2+} concentration in the intercellular space.

ЛИТЕРАТУРА

1. Розанов А. Я., Трещинский А. Н., Хмелевский Ю. В.—Ферментативные процессы и их коррекция при экстремальных состояниях, Киев, Здоров'я, 1985.
2. Меерсон Ф. Э. Адаптация, стресс и профилактика, М., Наука, 1981.
3. Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма, М., Мир, 1977.
4. Newsholme E. A. FEBS Lett., v. 117, p. 121—134, 1980.
5. Сытинский И. А. Гамма-аминомасляная кислота и деятельности центральной нервной системы, Л., Наука, 1972.
6. Розанов В. А. Нейрохимия, т. 1, с. 406—419, 1982.
7. Tapia R.—In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), v. 3, p. 423—466, N. Y., London, Plenum Press, 1983.

8. Раевский К. С., Георгиев В. П. Медлиторные аминокислоты. М., Медицина. 1986.
9. Shank R. P., Campbell G. Le M.—In: Handbook of Neurochem. (ed. A. Lajtha), v. 3. p. 381—404. N. Y., London, Plenum Press, 1983.
10. Сущарь Н. А., Орехов В. С. Укр. биохим. журн., т. 54, с. 565—568, 1982.
11. Boer De Th., Bruinvels J. J., Neurochem., v. 23, p. 471—478, 1977.
12. Spink D., Porter T. G., Wu S. J., Martin D. L. Biochem. J., v. 231, p. 695—703, 1985.
13. Blindermann J. M., Maitre M., Ossola L., Mandel P. Eur. J. Biochem., v. 86, p. 143—152, 1987.
14. Wu J.—Y., Su Y. Y. T., Lam D. M. K., Schousboe A., Chude O. In: Research methods in Neurochemistry, v. 5, p. 129—174, 1981.
15. Rando R. J. Biol. Chem., v. 256, p. 1111—1114, 1981.
16. Seligmann B., Miller L. P., Brockmann D. E., Martin D. L. J. Neurochem., v. 30, p. 371—376, 1978.
17. Wu S. Y., Martin D. L. J. Neurochem., v. 42, p. 1607—1612, 1984.
18. Meeley M. P., Martin D. L. Cell. and Mol. Neurobiol., v. 3, p. 39—54, 1983.
19. Meeley M. P., Martin D. L. Cell. and Mol. Neurobiol., v. 3, p. 55—68, 1983.
20. Porter T. G., Spink D., Martin S., Martin D. L. Biochem. J., v. 231, p. 705—712, 1985.
21. Tursky T., Lussanova M. J. Neurochem., v. 30, p. 903—905, 1978.
22. Porter T. G., Martin D. L. J. Neurochem., v. 43, p. 1464—1476, 1984.
23. Porter T. G., Martin S. B., Martin D. L. J. Neurochem., v. 47, p. 468—471, 1986.
24. Benmelen Van F. J., Schouten M. J., Fekkes D., Bruinvels J. J. Neurochem., v. 45, p. 1471—1474, 1985.
25. John R. A., Fowler I. J. Biochem. J., v. 155, p. 645—651, 1976.
26. Maitre M., Cieselski L., Cash C., Mandel P. Eur. J. Biochem., v. 52, p. 157—169, 1975.
27. Ossola L., Maitre M., Blindermann J.—M., Mandel P. J. Neurochem., v. 34, p. 293—296, 1980.
28. Churchich J. E., Moses U. J. Biol. Chem., v. 256, p. 1101—1104, 1981.
29. Beeler T., Churchich J. E. Eur. J. Biochem., v. 85, p. 365—371, 1978.
30. Cash C., Maitre M., Cieselski L., Mandel P. FEBS Lett., v. 47, № 2, p. 199—203, 1974.
31. Bloch-Tardy M., Buzenet A., Fages C., Rolland B., Gonnard P. Neurochem. Res., v. 5, p. 1147—1154, 1980.
32. Cash C. D., Maitre M., Ossola L., Mandel P. Biochim. et biophys. acta, v. 524, p. 26—36, 1978.
33. Rivett A. J., Tipton K. F. Eur. J. Biochem., v. 117, p. 187—193, 1981.
34. Garfinkel D. J. Biol. Chem., v. 241, p. 3918—3929, 1966.
35. Конунникова Н. П. Нейрохимия, т. 5, с. 370—376, 1986.
36. Clark J. B., Niclas W. J.—In: Handbook of Neurochemistry (ed. A. Lajtha), 2nd ed., N. Y., London, Plenum Press, v. 7, p. 135—158, 1984.
37. Северин С. Е. Вестн. АМН СССР, т. 7, с. 53—67, 1968.
38. Nitsch C. J. Neurochem., v. 34, p. 822—830, 1980.
39. Tursky T., Brechtleva M., Lussanova M. Biologia (CSSR), v. 31, p. 923—929, 1976.
40. Mello de F. G. Dev. Brain Res., v. 14, p. 7—13, 1984.
41. Щипакина Т. Г. Нейрохимия и физиология синаптических процессов, Пушнито, с. 6—25, 1976.
42. Розанов В. А. Укр. биохим. журн., т. 59, с. 41—45, 1987.
43. Blindermann J.—M., Maitre M., Mandel P. J. Neurochem., v. 32, p. 245—246, 1979.
44. Gold B. I., Roth R. H. J. Neurochem., v. 32, p. 883—888, 1979.
45. Розанов В. А., Безамаута С. Нейрохимия, т. 5, с. 377—383, 1986.

46. Elliott K. A. C., Khaw R. T., Bilodeau L. Can. J. Biochem., т. 43, p. 407—416, 1965.
47. Дозаисович И. Н., Пикунев А. Т. Докл. АН БССР, т. 12, с. 556—559, 1968.
48. Розанов В. А., Рейтарова Т. Е. Укр. биохим. журн., т. 55, с. 671—763, 1983.
49. Balazs R., Machiana Y., Hammond B. J., Julian T., Richter A. Biochem. J., v. 116, p. 445—467, 1970.
50. Weissmann-Nanopoulos D., Belin M. P., Didier M., Agueru M., Partisani M., Maitre M., Pajot J. F. Neurochem. Int., № 6, p. 785—791, 1983.
51. Bardakdjian J., Tardy M., Pimoule C., Gonnard P. Neurochem. Res., v. 4, p. 517—527, 1979.
52. Gale K., Sarvey C., Stork J., Childs J. A., Yalisove, Dayhoff R. E. Brain Res., v. 307, p. 255—262, 1984.
53. Pussurella S., Atlante A., Barile M., Quagliaricello D. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 121, p. 770—778, 1984.
54. Schousboe A., Drejer J., Larssen O. M., Yu A. C. H., Hertz L. Acta Neurol., Scand., v. 69, № 5, p. 332—334, 1984.
55. Shank P., Campbell G. M. J. Neurochem., v. 42, p. 1153—1161, 1984.
56. Zisapel N., Zurgil N. Life Sci., v. 23, № 3, p. 231—236, 1978.
57. Hertz L., Wu P. H., Schousboe A. Neurochem. Res., v. 3, № 3, p. 313—323, 1970.
58. Schousboe A., Hertz L. Dale's Prince and Commun. between Neurons. Colloq. Neurochem. Group Biochem. Soc., Oxford, July, 1982, p. 113—141. Oxford c. a., 1983.
59. Balcar V. J., Mark J., Borg J., Mandel P. Neurochem. Res., v. 4, № 3, p. 339—354, 1979.
60. Рейтарова Т. Е., Розанов В. А., Тощий В. Н. Укр. биохим. журн., т. 59, № 2, с. 87—90, 1987.
61. Weissmann-Nanopoulos D., Belin N. F., Mandel P., Maitre M. Neurochem. Int., v. 6, p. 333—338, 1984.
62. Haslum P. J., Krebs H. A. Biochem. J., v. 88, p. 566—578, 1963.
63. Balazs R., Haslum R. J. Biochem. J., v. 94, p. 131—141, 1965.
64. McKhann G. M., Albers R. W., Sokoloff L., Michelson O., Tower D. B.—In Inhibition in the Nervous System and γ -Aminobutyric acid, p. 169. Oxford, Pergamon Press., 1960.
65. Cremer J., Cunningham V. J. Biochem. J., v. 180, p. 677—679, 1979.
66. Gjedde A., Crono Ch. Science, v. 214, № 4519, p. 456—457, 1981.
67. Cunningham V. J., Sarna G. S. J. Neurochem., v. 33, p. 433—437, 1979.
68. Muchiyama Y., Balazs R., Hammond B. J., Julian T., Richter D. Biochem. J., v. 116, p. 469—481, 1970.
69. Van der Heyden J. A. M., Venema K., Korff J. J. Neurochem., № 34, p. 1648—1653, 1980.
70. Yu A. C., Schousboe A., Hertz L. J. Neurochem., v. 49, p. 934—960, 1982.
71. Hawking R. A., Mans A. M.—In: Handbook of Neurochemistry (ed. by A. Lajtha), 2nd ed., N. Y., London, Plenum Press, v. 3, p. 259—294, 1983.
72. Laan J. W., Buer Th., Bruinvels J. J. Neurochem., v. 32, p. 1763—1780, 1979.
73. Van der Heyden J. A. M., Venema K., Korff J. J. Neurochem., № 34, p. 1648—1653, 1980.
74. Снежко М. А., Глемжа А. А. Биохимия, т. 41, с. 491—495, 1976.
75. Lal J. C. K., Cooper A. J. L. J. Neurochem., v. 47, p. 1376—1386, 1986.
76. Chan-Palay V., Wu J.—Y., Palay S. L. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., № 76, p. 2067—2071, 1979.
77. Kovachich G. B., Hangaard N. J. Neurochem., v. 28, p. 923—927, 1977.
78. Курбанов Б. И. Молекуляр. биол., т. 20, 12, с. 369—377, 1986.
79. Аюбаев А. Е., Курбанов Б. И.—В кн.: Молекулярные механизмы и регуляция энергетич. обмена. Тезисы докладов Всесоюзн. симпозиума, Пушкино, с. 13, 1986.
80. Covarrubias M., Tapia R. J. Neurochem., v. 34, p. 1682—1688, 1980.
81. Manzoni A. J. Neurochem., v. 46, p. 1894—1898, 1985.
82. Heart W. G., Churchich J. E. J. Biol. Chem., v. 259, p. 11459—11463, 1986.

Поступила 29. VIII 1988



ХРОНИКА

**ВСЕСОЮЗНОЕ СОВЕЩАНИЕ «МЕДИАТОРЫ И ПОВЕДЕНИЕ»
(Новосибирск, 14—16 июня 1988 г.)**

С 14 по 16 июня 1988 г. в Новосибирском Академгородке проходило Всесоюзное совещание «Медиаторы и поведение», организованное Институтом цитологии и генетики Сибирского отделения АН СССР и секцией нейрoхимии Научного совета по биохимии АН СССР.

Проведено 6 заседаний, на которых заслушано 36 докладов. Обсуждены следующие проблемы: 1. Роль медиаторов в генетической регуляции поведения; 2. Особенности медиаторных систем животных, селекционированных по поведению, и мутантов; 3. Медиаторы и нейропептиды в механизмах алкогольного предпочтения и агрессивного поведения; 4. Изменение рецепторного связывания медиаторов и поведение; 5. Медиаторы и нейромодуляторы в механизмах тревожных состояний и патологических форм поведения; 6. Взаимодействие медиаторных и модуляторных систем и поведение.

Генетические аспекты исследования роли медиаторов мозга в регуляции поведения в наибольшей степени были представлены новосибирскими учеными. В докладе *Н. К. Поповой* (Новосибирск) были обсуждены результаты многолетнего изучения роли серотонина в регуляции разных форм агрессивного поведения. Приведены данные, свидетельствующие о том, что генетическая регуляция функциональной активности серотониновой системы мозга осуществляется путем детерминации активности ключевого фермента синтеза серотонина-триптофангидроксилазы. Новые результаты о генотипической связи между активностью в мозгу тирозингидроксилазы и эмоциональным поведением, а также об изменении активности этого фермента при селекции по поведению представлены в докладах *Н. Н. Дыла*, *Н. С. Юдина*, *Г. С. Быковой* (Новосибирск). Привлекло внимание сообщение *А. И. Серовой* и *Е. В. Науменко* (Новосибирск) о роли катехоламинов мозга в механизмах наследственной predispositionности мышей к зоосоциальному доминированию. *Э. М. Никулина* и *Ю. А. Скринская* (Новосибирск) сообщили об особенностях генетического контроля метаболизма дофамина и его изменении при селекции животных на низкую агрессивность и у мышей с неврологической мутацией квейкинг. Большой интерес вызвали приведенные *А. В. Куликовым* и соавт. (Новосибирск) доказательства участия триптофангидроксилазы стриатума мозга в возникновении каталепсии и данные *М. А. Иль-*

сниковой (Новосибирск) и *А. В. Сергутиной* (Москва), о снижении активности АХЭ и изменении соотношения нейротрансмиттеров в мозгу у крыс, селекционированных на высокую предрасположенность к каталепсии. Об изменении содержания дофамина в нигростриарной системе и активности фосфодиэстеразы в коре и гиппокампе крыс, селекционированных по возбудимости периферического нерва сообщено *Н. В. Ширяевой* и соавт. (Ленинград), участие тирозинового фосфорилирования нейробелков в механизмах обучения дрозофилы показано *Е. И. Каракиным* и соавт. (Новосибирск, Ленинград). Об особенностях реакции мышей разных генетических групп на введение АКТГ⁴⁻¹⁰ сообщено *И. И. Полетасовой* и соавт. (Москва), роль генетически детерминированных особенностей серотонинергической системы мозга в реакции избегания у мышей освещена *Л. А. Корякиной* (Новосибирск).

Большой интерес вызвало заседание, посвященное роли медиаторов в механизмах алкогольного предпочтения. В докладах *А. В. Верстинской* и соавт. (Москва) были представлены данные о влиянии алкоголизации на опийную активность и содержание катехоламинов и гистамина в ряде структур мозга. Выявлены нарушения, сохраняющиеся в третьем поколении крыс, предки которых подвергались длительной алкоголизации. Последствиям алкоголизации беременных самок на способность к обучению и адаптивное поведение потомства было посвящено сообщение *С. С. Трофимова* и соавт. (Москва), в котором показано, что введение крысам в раннем возрасте натрия оксibuтирата предотвращает нарушения обучаемости. *А. И. Сотниченко* и соавт. (Москва) были представлены данные о зависимости метаболизма дофамина и эффектов нейротоксина МФТП от генотипа и отдела мозга. Изменениям уровня биогенных аминов в периферической крови больных разными формами алкоголизма был посвящен доклад *Г. Ф. Агафонова* и соавт. (Москва).

Специальное заседание было отведено проблеме рецепторов. В докладе *А. М. Жарковского* и *К. С. Чирсика* (Тарту) были обобщены обширные данные о роли D₁- и D₂-рецепторов в эффектах дофаминергических веществ. Методом радиолигандного связывания показано изменение α₂-рецепторного связывания (*Г. Т. Шишкина*; Новосибирск) и C₁- и C₂-серотонинергического рецепторного связывания (*Г. Б. Маслова, Д. Ф. Августиневич*; Новосибирск) в ряде образований мозга животных, селекционированных на низкую агрессивность по отношению к человеку; увеличение C₁- и C₂-серотонинергического рецепторного связывания (*Г. Б. Маслова, Д. Ф. Августиневич; И. П. Воронова*; Новосибирск); понижение ГАМК_A-рецепторов в гиппокампе и коре и уменьшение мест связывания [³H]спиперона и [³H]дипренорфина в мезолимбических структурах при слабом стрессе (*Р. А. Кийвест* и соавт., Тарту); межлинейные различия в состоянии и реакции бензодиазепиновых рецепторов на эмоциональный стресс (*М. А. Гордей, К. А. Наговицин и Ю. А. Бледнов*, Москва).

Большое внимание было уделено роли нейромедиаторов в механизмах возникновения тревожных состояний и патологических форм поведения. Была обсуждена роль холин- и серотонинергических систем мозга в невротических нарушениях поведения (*В. А. Пастухов, В. К. Болон-*

динский, Ленинград). Оригинальные данные об анксиогенном действии холинэстеразы-8-эргических механизмов были представлены в докладе Я. Э. Харро и соавт. (Тарту). Широко обсуждалась проблема роли серотонина в возникновении каталепсии (Е. Ю. Козмачкова, Т. А. Алексина; Новосибирск), в развитии депрессивного состояния у мышей, подвергавшихся длительным нападениям агрессора (Н. Н. Кудрявцева, И. В. Бахитановская; Новосибирск), в агрессивном поведении самцов мышей при действии феромонов (М. Б. Павлова и соавт., Ленинград). В докладах В. В. Лаврова и соавт. (Ленинград) и А. Е. Фаста, Е. А. Громоновой (Пушино) были приведены результаты, свидетельствующие об изменении биогенных аминов на периферии при экспериментальных неврозах и у животных с различной устойчивостью к стрессорному акустическому воздействию.

Взаимодействию медиаторных и модуляторных систем были посвящены обобщающие значительный и оригинальный материал доклады А. Н. Кравцова (Москва), Б. В. Журавлева и Е. В. Борисова (Москва), Т. П. Семеновой (Пушино), И. В. Бахитановской и Н. Н. Кудрявцевой (Новосибирск), Ю. А. Каткова и соавт. (Пушино). В докладе К. М. Герштейн и А. В. Сергутиной (Москва) приведены данные о различиях в действии 1-ДОФА на активность МАО-азы и глутаматдегидрогеназы в зависимости от исходной двигательной активности крыс. Функциональные особенности генеза слуховых вызванных потенциалов у мышей двух линий в связи с особенностями поведения и метаболизма серотонина и дофамина в мозгу были рассмотрены в докладе Ю. Н. Шварева и соавт. (Новосибирск).

На всех заседаниях совещания широко разворачивались оживленные прения. Доклады и дискуссии позволили участникам составить представление о современном состоянии роли медиаторов и модуляторов мозга в регуляции эмоциональных состояний и ряда видов поведения. Совещание продемонстрировало достаточно высокий уровень работы и способствовало дальнейшей консолидации усилий специалистов разного профиля (физиологов, нейрохимиков, генетиков, нейрофармакологов). Материалы совещания изданы в виде сборника.

ПОПОВА Н. К.



О ЗАСЕДАНИИ СЕКЦИИ НЕЙРОХИМИИ (6 июня 1988 г. Ереван)

6 июня 1988 г. в Ереване состоялось очередное заседание Секции нейрохимии Научного совета АН СССР по проблемам биохимии животных и человека.

На заседании секции большое внимание было уделено развитию приоритетных направлений нейрохимических исследований в СССР. По этому вопросу выступил председатель Секции нейрохимии академик АН АрмССР А. А. Галоян. Он отметил, что в настоящее время в СССР, как и во многих странах мира, развитие нейрохимии приобретает широкий размах. Секцией нейрохимии в СССР зарегистрировано около 50 нейрохимических лабораторий. О масштабах развития нейрохимии в нашей стране свидетельствует и деятельность Всесоюзного журнала «Нейрохимия». Ежегодное увеличение количества поступающего в журнал материала говорит о возрастающем внимании исследователей к нейрохимическим проблемам. Однако вызывает серьезную озабоченность отсутствие на сегодняшний день утвержденной программы развития нейрохимических исследований в СССР. Такое положение дел, по-видимому, связано с отсутствием в АН СССР компетентного органа, обладающего широкими полномочиями и способного определить приоритетные направления развития советской нейрохимии, что является существенным тормозом на пути развития отечественной нейрохимии и претворения ее достижений в практическую медицину. Это обстоятельство явилось также препятствием на пути своевременного претворения в жизнь ряда важнейших решений, выдвинутых Секцией нейрохимии по координации научно-исследовательских работ в области нейрохимии. А. А. Галоян подчеркнул, что в период перестройки всей научной деятельности АН СССР настало время создать на основе нашей секции Научный совет АН СССР по нейрохимии при Отделении биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений АН СССР. Этот совет будет призван оказывать реальную помощь данному отделению в определении приоритетных направлений развития нейрохимических исследований и составлении научно-исследовательских программ по нейрохимии.

Проф. Р. Н. Этингер, д. б. н. А. В. Арутюнян, проф. А. М. Герштейн, проф. Я. В. Белик, д. б. н. Н. Д. Ещенко, д. б. н. Н. П. Таранова, д. б. н. В. А. Березин, проф. А. А. Кричевская в своих выступлениях подчеркну-

ли особую важность для нейрохимиков добиться отдельной утвержденной программы развития нейрохимических исследований в СССР, поскольку лишь она способна в полной мере обеспечить финансирование нейрохимических исследований.

Проф. Н. Н. Демин, проф. Г. В. Априкян, проф. Н. К. Попова, к. б. и. В. С. Оганесян, д. б. и. Б. Н. Манухин указали на необходимость создания Научного совета АН СССР по нейрохимии при Отделении биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений АН СССР, который решит вопрос о принятии программы развития нейрохимических исследований в СССР и о финансировании этих исследований.

Член-корр. АН АрмССР К. Г. Каратезян, проф. Н. Н. Демин предложили поставить перед Президиумом АН СССР вопрос о создании Общества нейрохимиков СССР. Они подчеркнули, что такие общества существуют во многих социалистических и капиталистических странах и способствуют развитию нейрохимии.

В связи с этим вопросом акад. АН АрмССР А. А. Галоян добавил, что давно назрело время решить вопрос не только о создании Общества нейрохимиков СССР, которое, безусловно, будет способствовать развитию нейрохимии в нашей стране, но и о широком представительстве советских нейрохимиков в европейских и международных нейрохимических организациях, а также их регулярного участия на международных нейрохимических форумах, что является гарантом развития наиболее перспективных нейрохимических направлений в нашей стране. Подобные вопросы, неоднократно поднятые Секцией нейрохимии, еще не получили своего разрешения в АН СССР.

Члены Секции нейрохимии постановили: ходатайствовать перед Отделением биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений АН СССР о создании Научного совета АН СССР по нейрохимии, принятии отдельной программы по нейрохимическим исследованиям, проводимым в СССР и создании Общества нейрохимиков СССР. Члены Секции нейрохимии обязались в кратчайший срок прислать в секцию свои проекты программы для составления общей программы развития нейрохимических исследований в СССР.

На заседании был рассмотрен также вопрос о ходе выполнения решения Секции нейрохимии от 17.09.87 г. об организации Всесоюзных научно-методических центров по нейропептидам, рецепторам, мембранам и по вопросам патологической нейрохимии, призванных оказывать научно-методическую помощь всем заинтересованным нейрохимическим лабораториям СССР. А. А. Галоян сообщил членам Секции нейрохимии, что со стороны Секции было отправлено в Научный совет АН СССР по проблемам биохимии животных и человека ходатайство об организации Центра по нейропатологическим исследованиям на базе ИЭМ АМН СССР (г. Ленинград) и в настоящее время предпринимаются практические шаги по его организации.

Проф. Н. Н. Демин информировал присутствующих о том, что в ИЭМ АМН СССР будет организована лаборатория молекулярной нейробиологии под руководством д. б. н. С. А. Дамбиновой, которая будет

принимать стажеров из различных заинтересованных лабораторий страны. Для лаборатории, сказал он, построено специальное здание вместе с неврологической клиникой, выделена валюта для приобретения современного оборудования.

На заседании было принято решение ходатайствовать перед Отделением биохимии, биофизики и химии физиологически активных соединений АН СССР об организации Всесоюзного научно-методического центра по нейропептидам на базе Института биохимии АН АрмССР, учитывая широкий набор современных методов исследования по нейропептидам, наличие квалифицированных кадров и мнение компетентных ученых.

В качестве базы для организации научно-методических центров по мембранам и рецепторам были предложены для рассмотрения Институт химической физики АН СССР (Москва), Институт биоорганической химии АН СССР (Москва), Институт прикладной молекулярной биологии МЭ СССР (Москва), Институт эволюционной физиологии и биохимии АН СССР (Ленинград), Институт физиологии АН СССР (Тбилиси).

На заседании Секции нейрохимии был рассмотрен также вопрос об организациях регулярных школ и узких симпозиумов по наиболее актуальным нейрохимическим проблемам с целью подготовки молодых кадров. Проф. Н. Н. Демин, выступивший по этому вопросу, предложил первые школы провести по четырем наиболее актуальным проблемам нейрохимии: нейропептидам, мембранам, рецепторам и патологической нейрохимии. Проф. А. А. Галоян высказал мнение, что школы и узкие симпозиумы лучше организовать на базе крупных институтов, чтобы молодежь одновременно со слушанием докладов по актуальным проблемам нейрохимии знакомилась с деятельностью нейрохимических лабораторий, училась бы работать на современных приборах и осваивала современные методы.

БАРКУДАРЯН Н. А.



РЕФЕРАТЫ СТАТЕЙ, НАПРАВЛЕННЫХ НА ДЕПОНИРОВАНИЕ В ВИНТИ

УДК 616.831—001—092—259

ЗАХВАТ [^3H]ДОФАМИНА ПРЕПАРАТАМИ СИНАПТОСОМ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРОЛИКОВ В ДИНАМИКЕ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

ПАРХОМЕЦ В. П., ВАСИЛЬЕВ А. Н.

Исследовано влияние легкой экспериментальной черепно-мозговой травмы (ЛЧМТ) на кинетику высокоаффинного захвата [^3H]дофамина (ДА) синапсосомами больших полушарий (БП) и дисэнцефало-стволовых отделов (ДСО) мозга кроликов. Кроликов забивали через 15 мин, 2 ч, 1, 3, 7, 14 суток после ЛЧМТ.

Установлено, что через 15 мин после ЛЧМТ V захвата ДА в синапсосомах БП начинает снижаться и достигает своего минимума к 3 суткам (в 8,6 раз ниже контроля), после чего значение V повышается и через 14 суток достигает контрольного значения. Захват ДА синапсосомами ДСО через 15 мин повышается в 1,4 раза, после чего через 2 ч снижается в 3,6 раза и через 14 суток повторно повышается в 2 раза.

Через 15 мин после ЛЧМТ K_m захвата ДА синапсосомами БП мозга кроликов снижается в 33 раза и достигает минимума к 3 суткам после ЛЧМТ (в 78 раз ниже контроля). После этого наблюдается повышение K_m к 7 суткам после ЛЧМТ (в 6 раз ниже контроля). В синапсосомах, полученных из ДСО мозга кроликов, найдено достоверное снижение K_m , достигающее своего минимума через 15 мин после ЛЧМТ с последующим подъемом к контрольному уровню через 1 сутки после ЛЧМТ. Полученные данные указывают на изменение кинетических характеристик высокоаффинного захвата ДА синапсосомами БП и ДСО мозга кроликов в динамике ЛЧМТ.

7 с., ил., библиогр. 14.

Киевский НИИ нейрохирургии МЗ СССР.
Киевский государственный университет
им. Т. Г. Шевченко.

Поступила 23. VII 1988

Рукопись депонирована в ВИНТИ 14. 11. 88 № 8083—В88

ВЛИЯНИЕ ГЛУТАТИОНА НА АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНОВ
ГОЛОВНОГО МОЗГА

РЕВА А. Д., КУЗЬМЕНКО Е. А., ЧЕРНАЯ В. И.

Интерес к изучению влияния глутатиона (GSH и GSSG) на активность катепсिनов головного мозга и опухолей мозга обусловлен, главным образом, тем, что он по функциональной классификации относится к пептидам роста и концентрация его в ткани мозга (2—3 мкмоль/г ткани) превышает концентрацию аминокислот и пептидов; кроме этого, функция его как естественного тиолового трипептида во многом еще не выяснена.

Опыты проводили на мозгу человека, крыс линии *Wistar*, быка и свиньи. По данным, полученным в нашей лаборатории, флуориметрическим методом, в мозгу человека в норме GSH составляет 92,3 мг%, а GSSG—7,7 мг%; в доброкачественных и злокачественных опухолях мозга человека содержание его достоверно ниже по сравнению с мозгом в норме.

Глутатион (GSH) в опытах *in vitro* в концентрациях от 0,35 до 1,4 мкмоль не влияет на активность катепсина D гомогенатов мозга. При прибавлении 2,8 мкмоль и выше наблюдается достоверное повышение активности фермента мозга человека и исследованных животных, причем по мере увеличения концентрации добавленного GSH активность повышалась.

Противоположные результаты получены в аналогичных опытах, при добавлении в пробы адекватных количеств GSSG. Опыты, проведенные в такой же постановке с тканью печени, дали аналогичные результаты. Внутривенное введение GSH или GSSG крысам линии *Wistar* из расчета 8 мкмоль на г массы животного не влияло на активность катепсина D в ткани мозга, так как экзогенный глутатион не проникает через ГЭБ; в печени через 15 мин после внутривенного введения глутатиона (GSH или GSSG) он повышал активность катепсина, а через 30 мин после введения этот эффект прекращался.

В опытах *in vitro* исследовали влияние вводимого в инкубационную среду 2,8 и 5,6 мкмоль GSH или GSSG на активность катепсина D различных опухолей головного мозга человека. Опыты показали, что в опухолях мозга активность катепсина D значительно снижалась, в глоблостоме в 6 раз, в саркоме—в 2 раза, в астроцитоме и эозинофильной granulоме подавлялась полностью. Полученные результаты позволяют рассматривать глутатион как регулятор активности исследуемых катепсинов; кроме этого, данные могут быть использованы при диагностике опухолей.

8 с., ил. 3, библиогр. 21

Кафедра биохимии и биофизики
Днепропетровского госуниверситета,
Днепропетровская областная больница
им. И. И. Мечникова

Получила 14. IV 1988

Резюме депонирована в ВИНТИ 14. II. 88 № 8086—В88

УБАИНЗАВИСИМОЕ ДЫХАНИЕ НЕЙРОНА В НОРМЕ И ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ СИНАПТИЧЕСКОМ РАЗДРАЖЕНИИ

СЕРГЕЕВА С. С.

Целью настоящей работы было выявить связь между функциональной активностью убаинчувствительного Na^+ , K^+ -насоса и развитием таких сложных нейрофизиологических реакций, как привыкание и сенситизация.

Объектом исследования служили нейроны Ретциуса медицинской пиявки, для которых характерна калий-натриевая природа потенциала действия (ПД) и наличие высокоактивного Na^+ , K^+ -насоса в плазмалемме.

Проводили синаптическую активацию этой клетки силой тока $3 \cdot 10^{-4}$ А, частотой 0,5 и 10 Гц, в течение 10 мин. Аппликация убаина (0,1 мМ) на нейрон вызывает в первые 1,5—2 мин увеличение его импульсной активности (ИА). Затем наблюдается полный ее блок. В первые 20—30 с происходит торможение дыхания клетки на $34,0 \pm 4,0\%$. Последнее может свидетельствовать о том, что около 34% кислорода, поглощаемого клеткой в норме, идет на обеспечение работы ее Na^+ , K^+ -насоса.

Высокочастотное синаптическое раздражение нейрона (частотой 10 Гц) вызывает развитие реакции привыкания. При этом вклад убаинчувствительного дыхания в общее дыхание клетки составляет $13,0 \pm 2,5\%$.

Низкочастотное синаптическое раздражение нейронов (частотой 0,5 Гц) приводит к реакции облегчения, когда клетка на каждый толчок раздражающего тока отвечает несколькими ПД. Убаинзависимое дыхание клетки в этом случае составляет $45 \pm 4\%$.

Таким образом, развитие привыкания сопровождается торможением активности Na^+ , K^+ -насоса, тогда как при облегчении наблюдается его активация. Обсуждается возможная роль Na^+ , K^+ -насоса в цепи реакций, лежащих в основе нейрональной пластичности.

7 с., ил. 3, библиогр. 15

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

Ленинград

Поступила 17. IV 1988

Рукопись депонирована в ВИНТИ 14. 11. 88 № 8088—В88

ВЛИЯНИЕ ГЛУТАТИОНА НА АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНОВ
ГОЛОВНОГО МОЗГА

РЕВА А. Д., КУЗЬМЕНКО Е. А., ЧЕРНАЯ В. И.

Интерес к изучению влияния глутатиона (GSH и GSSG) на активность катепсина головного мозга и опухолей мозга обусловлен, главным образом, тем, что он по функциональной классификации относится к пептидам роста и концентрация его в ткани мозга (2—3 мкмоль/г ткани) превышает концентрацию аминокислот и пептидов; кроме этого, функция его как естественного тиолового трипептида во многом еще не выяснена.

Опыты проводили на мозгу человека, крыс линии *Wistar*, быка и свиньи. По данным, полученным в нашей лаборатории, флуориметрическим методом, в мозгу человека в норме GSH составляет 92,3 мг%, а GSSG—7,7 мг%; в доброкачественных и злокачественных опухолях мозга человека содержание его достоверно ниже по сравнению с мозгом в норме.

Глутатион (GSH) в опытах *in vitro* в концентрациях от 0,35 до 1,4 мкмоль не влияет на активность катепсина D гомогенатов мозга. При прибавлении 2,8 мкмоль и выше наблюдается достоверное повышение активности фермента мозга человека и исследованных животных, причем по мере увеличения концентрации добавленного GSH активность повышалась.

Противоположные результаты получены в аналогичных опытах, при добавлении в пробы адекватных количеств GSSG. Опыты, проведенные в такой же постановке с тканью печени, дали аналогичные результаты. Внутривенное введение GSH или GSSG крысам линии *Wistar* из расчета 8 мкмоль на г массы животного не влияло на активность катепсина D в ткани мозга, так как экзогенный глутатион не проникает через ГЭБ; в печени через 15 мин после внутривенного введения глутатиона (GSH или GSSG) он повышал активность катепсина, а через 30 мин после введения этот эффект прекращался.

В опытах *in vitro* исследовали влияние вводимого в инкубационную среду 2,8 и 5,6 мкмоль GSH или GSSG на активность катепсина D различных опухолей головного мозга человека. Опыты показали, что в опухолях мозга активность катепсина D значительно снижалась, в глоблостоме в 6 раз, в саркоме— в 2 раза, в астроцитоме и эозинофильной granulоме подавлялась полностью. Полученные результаты позволяют рассматривать глутатион как регулятор активности исследуемых катепсинов; кроме этого, данные могут быть использованы при диагностике опухолей.

8 с., ил. 3, библиогр. 21

Кафедра биохимии и биофизики
Днепропетровского госуниверситета,
Днепропетровская областная больница
им. И. И. Мечникова

Получила 14. IV 1988

Резюме депонирована в ВИНТИ 14. II. 88 № 8086—В88

УБАИНЗАВИСИМОЕ ДЫХАНИЕ НЕЙРОНА В НОРМЕ И ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ СИНАПТИЧЕСКОМ РАЗДРАЖЕНИИ

СЕРГЕЕВА С. С.

Целью настоящей работы было выявить связь между функциональной активностью убаинчувствительного Na^+ , K^+ -насоса и развитием таких сложных нейрофизиологических реакций, как привыкание и сенситизация.

Объектом исследования служили нейроны Ретциуса медицинской пиявки, для которых характерна калий-натриевая природа потенциала действия (ПД) и наличие высокоактивного Na^+ , K^+ -насоса в плазмалемме.

Проводили синаптическую активацию этой клетки силой тока $3 \cdot 10^{-4}$ А, частотой 0,5 и 10 Гц, в течение 10 мин. Аппликация убаина (0,1 мМ) на нейрон вызывает в первые 1,5—2 мин увеличение его импульсной активности (ИА). Затем наблюдается полный ее блок. В первые 20—30 с происходит торможение дыхания клетки на $34,0 \pm 4,0\%$. Последнее может свидетельствовать о том, что около 34% кислорода, поглощаемого клеткой в норме, идет на обеспечение работы ее Na^+ , K^+ -насоса.

Высокочастотное синаптическое раздражение нейрона (частотой 10 Гц) вызывает развитие реакции привыкания. При этом вклад убаинчувствительного дыхания в общее дыхание клетки составляет $13,0 \pm 2,5\%$.

Низкочастотное синаптическое раздражение нейронов (частотой 0,5 Гц) приводит к реакции облегчения, когда клетка на каждый толчок раздражающего тока отвечает несколькими ПД. Убаинзависимое дыхание клетки в этом случае составляет $45 \pm 4\%$.

Таким образом, развитие привыкания сопровождается торможением активности Na^+ , K^+ -насоса, тогда как при облегчении наблюдается его активация. Обсуждается возможная роль Na^+ , K^+ -насоса в цепи реакций, лежащих в основе нейрональной пластичности.

7 с., ил. 3, библиогр. 15

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

Ленинград

Поступила 17. IV 1988

Рукопись депонирована в ВИНТИ 14. 11. 88 № 8088—В88

УКАЗАТЕЛЬ АВТОРОВ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ТОМЕ 7, 1988 г.

- Абдувахобов А. А. 592 (4)
Абелян Ж. Г. 532 (4)
Абрамян К. С. 99, 151 (1), 389 (3)
Абрамян С. С. 61, 78 (1)
Абуттидзе К. Д. 242 (2)
Аврова Н. Ф. 307 (2)
Аврущенко М. Ш. 232 (2)
Адамян М. Х. 405 (3)
Азарян А. В. 108 (1)
Азатян К. В. 18 (1)
Айрапетян С. Н. 18 (1)
Акопян А. А. 405 (3)
Алехина Т. А. 525 (4)
Алябьева Т. Н. 73 (1)
Амбарцумян Н. С. 425 (3)
Антонян А. А. 405 (3)
Апиркян Г. В. 348 (3)
Аракелян Л. Н. 78 (1)
Арменян А. Р. 78 (1)
Арутюнян А. В. 348 (3), 500 (4)
- Бабиичук Г. А. 368 (3)
Бадалян Л. Д. 558 (4)
Базян А. С. 165 (2)
Балашов А. М. 73 (1)
Балашова Е. К. 211 (2)
Бархударян Н. А. 519, 632 (4)
Беджаниян К. Д. 558 (4)
Белик Я. В. 382 (3)
Богданова Н. А. 189 (2)
Бондарева В. М. 268 (2)
Бондаренко Т. И. 153 (1)
Бондарь О. И. 238 (2)
Боровок Н. В. 178 (2)
Бочко И. Ф. 532 (4)
Брайловская И. В. 574 (4)
Брусованик В. И. 357 (3)
Буданцев А. Ю. 11 (1), 445 (3), 509 (4)
Бунятян Г. Г. 242 (2)
Бурбаева Г. Ш. 155 (1)
Бурдакова Е. Б. 178 (2)
Бурназян Л. Б. 500 (4)
- Валко К. 519 (4)
Варфоломеев С. Д. 304 (2)
Васильев А. Н. 87, 152 (1), 238 (2), 635 (4)
Веретенников Н. А. 47 (1)
Войтенко Н. Н. 204 (2), 525 (4)
Возный Я. В. 108 (1)
- Воронина Т. А. 483 (4)
Востриков В. М. 155 (1)
- Габриелян С. К. 532 (4)
Галоян А. А. 61, 108 (1), 217 (2), 436 (3), 519 (4)
Галфаян В. Г. 311 (2)
Гарсия А. 225 (2)
Гасанова Л. Г. 247 (2)
Геворкян Г. А. 500 (4)
Гиммельрейх Н. Т. 126 (1)
Глебов Р. Н. 337 (1)
Годухин О. В. 11 (1)
Головина Т. Н. 91 (1)
Голубева Е. Е. 331 (3)
Горкин В. Э. 204 (2)
Гриневский В. П. 33 (1)
Гринкевич Л. Н. 251 (2)
Григорьева Г. М. 546, 592 (4)
Григорян Л. А. 61 (1)
Грищенко Е. С. 153 (1)
Громова Е. А. 255 (2)
Гулидова Г. П. 114 (1)
Гулян Э. А. 348 (3)
Гураниц Б. Я. 217 (2)
Гурик В. Н. 432 (3)
- Дадалян С. С. 18 (1)
Даниловский М. А. 456 (3)
Демин Н. Н. 303 (2), 375 (3), 584 (4)
Демин Ю. М. 397 (3)
Дмитриев А. Д. 588 (4)
Дроздов А. Э. 83 (1)
Дубинская Н. И. 178 (2)
Дудина Т. В. 68 (1)
- Егорян Р. Г. 566 (4)
Елкина А. И. 68 (1)
Ерзян С. С. 500 (4)
Ефимова М. Г. 574 (4)
- Жанаева Е. Ю. 274 (2)
Жариков С. Н. 11 (1), 509 (4)
Жарикова А. Д. 509 (4)
Жулид В. В. 172 (2), 313 (2)
- Заблудовский А. А. 172, 197 (2)
Зайцев С. В. 304 (2)
Закарян Т. Р. 519 (4)
Захарян Р. А. 425 (3)
Зиматкин С. М. 607 (4)

Иванов В. А. 255 (2)
 Исмаилов Ю. Б. 247 (2)
 Казарян А. Р. 405 (3)
 Казарян Б. А. 566 (4)
 Кандыбо Т. С. 68 (1)
 Капралов А. А. 382 (3)
 Карагезян К. Г. 397 (3), 597 (4)
 Каралетян Р. О. 61 (1), 436 (3)
 Киракосян А. С. 311 (2)
 Ключник Т. П. 155 (1)
 Ковалев В. Ю. 375 (3)
 Коденцова В. М. 114 (1)
 Козлов Ю. П. 357 (3)
 Колпаков В. Г. 525 (4)
 Кондратьев А. Д. 331 (3), 493 (4)
 Корягин А. С. 538 (4)
 Кравцов Г. М. 357 (3)
 Краснова Т. И. 546 (4)
 Кочарян М. Г. 348 (3)
 Кричевская А. А. 153 (1)
 Кругликов Р. И. 165 (3)
 Кудрин В. С. 323 (3)
 Кутушева А. И. 211 (2)
 Кузнецова Т. В. 602 (4)
 Кузьменко Е. А. 636 (4)
 Куликова О. Г. 189 (2)
 Кучеренко Н. Е. 87 (1)
 Кучеренко С. Н. 152 (1)
 Лейбуш Б. Н. 268 (2)
 Асжиева И. П. 546 (4)
 Линдрос К. О. 607 (4)
 Ансачев П. Д. 251 (2)
 Лиходий С. Ст. 415 (3)
 Лиходий Ст. С. 415 (3)
 Лишко В. К. 126 (1)
 Мадершпах К. 493 (4)
 Майзелис М. Я. 197 (2)
 Маликов У. М. 584 (4)
 Мамедов З. Г. 247 (2)
 Манукян К. А. 53 (1)
 Маркин В. А. 436 (3)
 Маркина Н. В. 483 (4)
 Маршак Т. А. 232 (2)
 Матышевская О. П. 238 (2)
 Мерсон Ф. З. 588 (4)
 Меликян А. М. 242 (2)
 Мельник В. И. 337 (1)
 Менджерицкий А. М. 312 (2)
 Микеладзе Д. Г. 242 (2)
 Мирошниченко И. И. 3 (1), 323 (3)
 Морсесян Н. О. 500 (4)
 Монсеев И. Н. 264 (2)

Молочкина Е. М. 178 (2)
 Морковкин В. М. 440 (3)
 Морозов Г. В. 440 (3)
 Москвитина Т. А. 204 (2)

Назарян К. Б. 566 (4)
 Нагиев Э. Р. 428 (3)
 Налбандян Р. М. 242 (2), 389 (3)
 Наливаева Н. Н. 307 (2)
 Науменко Е. В. 288 (2)
 Неробкова А. Н. 483 (4)
 Нерсисян Ц. М. 348 (3)
 Нилова Н. С. 259 (2)

Овсян Г. А. 397 (3), 597 (4)
 Олесья Г. А. 397 (3), 597 (4)
 Овсепян А. М. 397 (3), 597 (4)
 Оганесян В. С. 558 (4)
 Опарина Т. И. 95 (1)
 Орлова Э. Х. 588 (4)
 Остапенко И. А. 574 (4)
 Остапенко А. И. 152 (1)

Паченко А. Ф. 73 (1)
 Паронян Э. Х. 61, 78 (1)
 Пархомец В. П. 635 (4)
 Паценко А. А. 33 (1)
 Паценко А. Е. 154 (1)
 Пожаруи С. В. 26 (1)
 Поспеланова Г. А. 331 (3)
 Попова Н. К. 274 (2), 525, 629 (4)
 Пшеничкова М. Г. 588 (4)
 Пылова С. И. 39 (1)

Раевский К. С. 3 (1), 323 (3)
 Разумовская Н. И. 189 (2)
 Рева А. Д. 636 (4)
 Рожицкая И. И. 588 (4)
 Розанов В. А. 611 (4)
 Розенгарт В. И. 211 (2)
 Ростока А. М. 154 (1)
 Ростомян М. А. 99, 151 (1), 532 (4)
 Русаков Ю. И. 268 (2)

Саакян С. А. 436 (3)
 Саакян Ф. М. 436 (3)
 Савинкова А. К. 204 (2)
 Самедова Н. Ф. 247 (2)
 Сарибекян Г. А. 311 (2)
 Северин Е. С. 331 (3)
 Селищева Л. А. 357 (3)
 Семсенея Н. Н. 432 (3)
 Семенова Н. А. 415 (3)
 Семенова Т. П. 255 (2)

Сергеев С. С. 637 (4)
Сибельдина А. А. 415 (3)
Скобелева Н. А. 425 (3)
Соколова Н. Е. 492 (4) 483 (4)
Соломония Р. О. 493 (4)
Срапиони Р. М. 61, 78 (1), 436 (3), 532 (4)
Степаненко С. П. 26 (1)
Супоров Н. Н. 331 (3)
Сукиасян Л. В. 597 (4)
Сурвилладзе З. Г. 467 (3)

Тайц М. Ю. 68 (1)
Таранова Н. П. 259 (2) 483 (4)
Тигранян Р. А. 375 (3)
Тиллябасв З. 592 (4)
Титов С. Ю. 337 (1)
Томачинская А. И. 87 (1)
Третьяк Т. М. 255 (2)
Турсунова Ю. Д. 155 (1)
Туряница И. М. 154 (1)
Туряница С. М. 154 (1)
Тюленев В. И. 382 (3)

Уварова Т. М. 602 (4)
Ускова Н. И. 312 (2)

Фоминко А. Н. 26 (1)

Халмуратов А. Г. 26 (1)
Хачатрян Г. С. 405 (3)
Хватоца Е. М. 225 (2), 538 (4)
Хованских А. Е. 546 (4)

Чароян И. О. 312 (2)
Черная В. И. 636 (4)
Чернявская Л. И. 509 (4)
Чехонин В. П. 440 (3)
Чижевская И. В. 368 (3)

Шарова Н. П. 217 (2)
Шароян С. Г. 389 (3)
Шеманов А. Ю. 323 (3)

Шерстобитов О. Е. 211 (2)
Шифман М. И. 358 (3)
Шихов С. Н. 197 (2)
Шрагин А. С. 357 (3)
Штарк М. Б. 251 (2)

Щербаков В. М. 440 (3)

Этингер Р. Н. 574 (4)

CUMULATED AUTHOR INDEX

(volum 4, 1988)

- Abelyan Zh. G. 532 (4)
 Abdugakhov A. A. 592 (4)
 Abramian K. S. 99 (1), 151 (1), 389 (3)
 Abramyan S. S. 61 (1), 78 (1)
 Abutidze K. D. 242 (2)
 Adamian M. Ch. 465 (3)
 Akopian A. A. 405 (3)
 Alekhina T. A. 525 (4)
 Antonian A. A. 405 (3)
 Alyebieva T. N. 73 (1)
 Aprikian G. V. 348 (3)
 Arakelian L. N. 78 (1)
 Armenian A. R. 78 (1)
 Aurora N. F. 307 (2)
 Avrushchenko M. Sh. 232 (2)
 Ayrapetyan S. N. 18 (1)
 Azaryan A. V. 108 (1)
 Azatyan K. V. 18 (1)
 Babichuk G. A. 368 (3)
 Badalyan L. L. 558 (4)
 Balashov A. M. 73 (1)
 Balashova E. K. 211 (2)
 Barkhudaryan N. A. 519, 632 (4)
 Bazyan A. S. 65 (2)
 Bedzhanyan K. D. 558 (4)
 Belik Ya. V. 382 (3)
 Bogdanova N. A. 189 (2)
 Bochkov I. F. 532 (4)
 Bondar O. I. 238 (2)
 Bondarenko T. I. 153 (1)
 Bondareva V. M. 268 (2)
 Borovok N. V. 178 (2)
 Brailovskaya I. V. 574 (4)
 Brusovnik V. I. 357 (3)
 Budantsev A. Yu. 11 (3), 445 (3), 509 (4)
 Buniatian G. H. 242 (2)
 Burbaeva T. Sh. 155 (1)
 Burlakova Ye. B. 178 (2)
 Burnasyan L. B. 500 (4)
 Charoyan I. O. 312 (2)
 Chekhonin V. P. 440 (3)
 Chernaya V. I. 636 (4)
 Chernyavskaya L. 509 (4)
 Chizhevskaya I. V. 368 (3)
 Dadalyan F. S. 18 (1)
 Danilovsky M. A. 456 (3)
 Dmitriev A. D. 588 (4)
 Doemin N. N. 303 (2), 375 (3), 584 (4)
 Drozdov A. Z. 83 (1)
 Dubinskaya N. I. 178 (2)
 Dudina T. V. 68 (1)
 Dycmin Ye. M. 397 (3)
 Efimova M. G. 574 (4)
 Egeryan R. U. 566 (4)
 Eranyan S. S. 500 (4)
 Etingof R. N. 574 (4)
 Fomenko A. I. 26 (1)
 Gabrielyan Zh. G. 532 (4)
 Galfayan V. T. 311 (2)
 Galoyan A. A. 61 (1), 108 (1), 217 (2), 436 (3), 519 (4)
 Garsia A. 225 (2)
 Garanova L. G. 247 (2)
 Gevorgyan G. A. 500 (4)
 Glebov R. N. 337 (3)
 Godukhin O. V. 11 (1)
 Golovina T. N. 91 (1)
 Golubeva E. E. 331 (3)
 Gorkin V. Z. 204 (2)
 Gourin V. N. 432 (3)
 Grigor'eva G. M. 546 (4)
 Grigoryan L. A. 61 (1)
 Grinevich V. P. 33 (1)
 Grinkevitch L. M. 251 (2)
 Grishchenko E. S. 153 (1)
 Gromova E. A. 252 (2)
 Gulian E. A. 348 (3)
 Gulidova G. P. 114 (1)
 Gurvits B. Ya. 217 (2)
 Hambartsumyan N. S. 425 (3)
 Haroutunian A. V. 348 (3), 500 (4)
 Himmelreich N. H. 126 (1)
 Hoveyan G. A. 397 (3)
 Hovsepian L. M. 397 (3)
 Ismailov I. B. 247 (2)
 Ivanov V. A. 255 (2)

- Jhanaeva E. J. 271 ()
 Jharikov S. I. 11 (1)
 Jhulin V. V. 172 (2) 313 (2)
- Kandybo T. S. 68 (1)
 Kapralov A. A. 383 (3)
 Karageozian K. G. 397 (3), 597 (1)
 Karapetyan R. O. 6 (1), 436 (3)
 Kazarian A. P. 405 (3)
 Kazaryan B. A. 566 (4)
 Khaehatryan G. S. 405 (3)
 Khalmuradov A. G. 25 (1)
 Khvatova E. M. 225 (2), 538 (4)
 Khovanskikh A. E. 546 (4)
 Kirakosova A. S. 311 (2)
 Klyushnik T. P. 185 (1)
 Kocharian M. G. 345 (3)
 Kodentsova V. M. 114 (1)
 Kolpakov V. G. 525 (4)
 Kondratyev A. D. 231 (3), 493 (4)
 Koryagin A. S. 538 (4)
 Kovalev V. Yu. 375 (3)
 Kozlov Yu. P. 357 (3)
 Krasnova T. I. 546 (4)
 Kravtsov G. M. 357 (3)
 Kruglikov P. I. 165 (2)
 Krychevskaya A. A. 153 (1)
 Kucherenko S. N. 152 (1)
 Kudrin V. S. 3 (1), 323 (3)
 Kugusheva L. T. 211 (2)
 Kulikova O. G. 169 (2)
 Kulokova O. G. 189 (2)
 Kuz'menko E. A. 656 (1)
 Kuznetsova T. V. 602 (4)
- Leibush B. N. 268 (2)
 Lezhneva I. P. 546 (4)
 Likhody St. S. 415 (4)
 Lindors K. O. 607 (4)
 Likhody St. S. 415 (3)
 Lishko V. K. 126 (1)
- Maderspach K. 493 (4)
 Maizelis M. Ya. 157 (2)
 Malikov U. M. 584 (4)
 Mamedov Z. G. 247 (2)
 Manukian K. L. 53 (1)
 Matyshevskaya O. P. 238 ()
 Markin V. A. 436 (3)
 Markina N. V. 483 (4)
 Marshuk T. L. 232 (2)
 Meerson F. Z. 588 (4)
 Melikyan A. M. 242 (2)
 Melnik V. I. 357 (3)
 Mendzheritskiy A. M. 312 ()
- Mikeladze D. G. 212 (2)
 Mirzelnichenko I. I. 3 (1), 323 (3)
 Moiseev I. N. 264 ()
 Molotchikina Ye. M. 178 (2)
 Morkovkin V. M. 440 (3)
 Morezov G. V. 440 (3)
 Moskvitina T. A. 204 (2)
 Movsesiyan N. O. 500 (4)
- Nagiev E. K. 428 (3)
 Nalbandyan R. M. 242 (2)
 Nalivayeva N. N. 307 (2)
 Naumenko E. V. 288 (2)
 Nazaryan K. B. 566 (4)
 Nersissian Tz. M. 348 (3)
 Nerolikova L. V. 483 (4)
 Nilova N. S. 259 (2)
- Oganesyan V. S. 558 (4)
 Odabashian A. B. 436 (3)
 Oparina T. I. 55 (1)
 Orlova E. Kh. 588 (1)
 Ostapenko I. A. 574 (4)
 Ostapchenko L. T. 152 (1)
 Oveyan G. A. 597 (4)
 Ovsepyan L. M. 557 (4)
- Panchenko L. F. 73 (1)
 Parkhomets V. P. 635 (4)
 Paronian Z. Ch. 73 (1)
 Paronyan Z. Kh. 61 (1)
 Patsenko A. A. 33 (1)
 Popova N. K. 274 (2), 525, 629 (4)
 Posypanova G. A. 331 (3)
 Pozharov S. V. 26 (1)
 Pshennikova M. G. 558 (1)
 Putilina F. E. 95 (1)
 Pylova S. 31 (1)
- Rayevsky K. S. 83 (1), 323 (3)
 Razumovskaya N. I. 179 (2)
 Reva A. D. 636 (4)
 Rosengart V. T. 211 (2)
 Rostoka L. M. 151 (1)
 Roztomian M. A. 99 (1), 151 (1), 532 (4)
 Rozanov V. A. 611 (4)
 Rozhitskaya I. I. 583 (4)
 Rusakov Yu. I. 268 (2)
- Saakian F. M. 436 (3)
 Saakian S. A. 436 (3)
 Samedova N. F. 247 (2)
 Sarilekyan G. A. 311 (2)
 Savinkova L. K. 204 (2)

- Selishebeva A. A. 357 (5)
 Semeneyna I. N. 432 (3)
 Semionova N. A. 415 (3)
 Semyonova T. P. 255 (2)
 Sergeeva S. S. 637 (4)
 Severin E. S. 331 (3)
 Shragin A. S. 357 (3)
 Sharova N. P. 217 (2), (4)
 Sharoyan S. G. 389 (3)
 Sheherbakov V. M. 440 (3)
 Shemanov A. Yu. 323 (3)
 Sherstobitov O. E. 211 (2)
 Shifman M. I. 368 (3)
 Shikhov S. N. 197 (2)
 Shtark M. B. 251 (2)
 Sibeldina L. A. 415 (3)
 Solomonina R. O. 493 (4)
 Sokolova N. E. 483 (4)
 Skobeleva N. A. 425 (3)
 Srapionian R. M. 61 (1), 78 (1),
 436 (3); 532 (4)
 Stepanenko S. P. 26 (1)
 Sukiasyan L. V. 597 (4)
 Surviladze Z. G. 467 (3)
 Suvorov N. N. 331(3)
 Taits M. Y. 68 (1)
 Taranova N. P. 259 (2), 483 (4)
 Tigranyan R. A. 375 (3)
 Tilyahaev Z. 592 (4)
 Titov S. Y. 337 (5)
 Tomachinskaya L. I. 87 (1)
 Tretyak T. M. 255 (2)
 Tursunova Yu. D. 155 (1)
 Turyanitsa I. M. 154 (1)
 Turyanitsa S. M. 154 (1)
 Tyulenev V. I. 382 (3)
 Uskova N. I. 312 (2)
 Uvarova T. M. 602 (4)
 Valko K. 519 (4)
 Vasiliev A. N. 152 (1), 238 (2),
 635 (4)
 Varfolomeev S. D. 304 (2)
 Veretennikov N. A. 47 (1)
 Voitenko N. N. 204 (2), 525 (4)
 Vostrikov V. M. 155 (1)
 Veronina T. A. 483 (4)
 Wezney Ya. V. 108 (1)
 Yelkina A. I. 68 (1)
 Zabludovsky A. L. 172 (2), 197 (2)
 Zaitsev S. V. 304 (2)
 Zakharyan R. A. 425 (3)
 Zakharyan T. R. 519 (4)
 Zharikov S. I. 509 (4)
 Zherikova A. D. 509 (4)
 Zimyatkin S. M. 607 (4)

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

Объем рукописи (включая резюме, список литературы и иллюстрации) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзора не должен превышать 20 с., кратких сообщений, рецензий и хроники—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 выношенные тушью на плотной белой бумаге или кальке, представляются в конверте в двух, а фотографии в трех экземплярах. На обороте каждого рисунка карандашом следует указать фамилии авторов, сокращенное название статьи и порядковый номер, для фотографий (на глянцевой бумаге) следует указать ее верх и низ. Подписи к рисункам и фотографиям представляются на отдельном листе. Замена фотоиллюстраций электрофоретических исследований рисованными схемами не допускается. Количество иллюстративного материала (таблицы и рисунки) не должно превышать в статьях 8, в кратких сообщениях—2.

5. Формулы и индексы должны быть написаны 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 чьей редакцией она издана, название издательства и место издания.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

Объем рукописи (включая резюме, список литературы и иллюстрации) не должен превышать 15 с., напечатанных на машинке через 2 интервала. Объем обзора не должен превышать 20 с., кратких сообщений, рецензий и хроники—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 выношенные тушью на плотной белой бумаге или кальке, представляются в конверте в двух, а фотографии в трех экземплярах. На обороте каждого рисунка карандашом следует указать фамилии авторов, сокращенное название статьи и порядковый номер, для фотографий (на глянцевой бумаге) следует указать ее верх и низ. Подписи к рисункам и фотографиям представляются на отдельном листе. Замена фотоиллюстраций электрофоретических исследований рисованными схемами не допускается. Количество иллюстративного материала (таблицы и рисунки) не должно превышать в статьях 8, в кратких сообщениях—2.

5. Формулы и индексы должны быть написаны 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 чьей редакцией она издана, название издательства и место издания.

СОДЕРЖАНИЕ

Соколова Н. Е., Таранова Н. П., Воронина Т. А., Неробкова Л. Н., Маркина Н. В. Нейрохимические и нейрофизиологические эффекты 2-этил-6-метил-3-оксипиридина в норме и при нарушении сна у крыс	483
Соломонян Р. О., Кондригов А. Д., Мадершлах К. Изучение влияния биогенных аминов на синтез гликопротеинов в нейрональной культуре мозга куриных эмбрионов	493
Арутюнян А. В., Мовсесян Н. О., Бирназян А. Б., Еранян С. С., Геворкян Г. А. ADP-рибозилирование в синаптических мембранах головного мозга крыс	500
Жарикова А. Д., Жариков С. П., Буданцев А. Ю., Чернявская Л. И. Функциональная активность транспортной системы L-глутамата при модификации мембран синапсом олеиновой кислотой	509
Галоян А. А., Бархударян Н. А., Валик К., Закарян Т. Р. Очистка и характеристика кортикаросуживающих пептидных факторов гипоталамуса	519
Попова Н. К., Войтенко Н. Н., Колпаков В. Г., Алексина Т. А. Особенности MAO мозга крыс с наследственной предрасположенностью к развиту каталепсии	525
Срапионян Р. М., Абелян Ж. Г., Ростомян М. А., Габриелян С. К., Бочко Н. Ф. Радиомунологические исследования кардиозактивного белок-гормонального комплекса гипоталамуса	532
Хаватова Е. М., Корятин А. С. Каталитические свойства и механизмы регуляции активности Н ⁺ -АТФазы митохондрий мозга	538
Краснова Т. И., Григорьева Г. М., Хованских А. М., Лежнева Н. П. Взаимодействие холинэстеразы мозга капустной мухи <i>Della brassicae</i> с катионными лигандами	546
Оганесян В. С., Бадалян А. А., Беджамян К. Д. Координирование действия модуляторов растворимой фосфатаззависимой глутаминазы мозга трифодол-тиронином	558
Назарян К. Б., Егоян Р. У., Казарян Б. А. Очистка и характеристика фосфоглицератмутаза головного мозга крупного рогатого скота	566
Ефимова М. Г., Остапенко Н. А., Брайловская И. В., Этиктоф Р. Н. Изменения перекисного окисления липидов при наследственной дегенерации сетчатки	574
Краткие сообщения	
Маликов У. М., Демин Н. Н. Метаболизм серотонина в головном мозгу крыс при лишении их парадоксальной фазы сна	584
Месерсон Ф. Э., Дмитриев А. Д., Писенникова М. Г., Орлова Э. Х., Рожникова Н. И. Влияние предварительной адаптации к физической нагрузке на содержание иммунореактивного Leu-энкефалина во фронтальной коре головного мозга при стрессе	588
Абдулахабова А. А., Григорьева Г. М., Тилябасов З. Метилсульфометилаты: О-алкил-S-(β-этилмеркаптоэтил)метилтиофосфонатов как эффекторы для изучения холинэстераз различного происхождения	592
Каратсезян К. Г., Овсепян Г. А., Овсепян А. М., Сухиасян А. В. Количественные изменения фосфолипидов и их жирнокислотного состава в головном мозгу белых крыс при односторонней ганглиосимпатэктомии	597
Уварова Т. В., Кузнецова Т. В. Полипептидный состав белков субклеточных образований головного мозга крыс после гипоксии, перенесенной на ранних стадиях индивидуального развития	602

<i>Зиматкин С. М., Лимдрос К. О.</i> Альдегиддегидрогеназа мозга линейных крыс, различающихся отношением к алкоголю	607
---	-----

Обзоры

<i>Розанов В. А.</i> Механизмы регуляции ГАМК-шунта в головном мозгу	611
--	-----

Хроника

<i>Попова Н. К.</i> Всесоюзное совещание «Медиаторы и поведение»	629
<i>Бархударян Н. А.</i> О заседании секции нейрохимии	632

Рефераты статей, направленных на депонированные в ВИНТИ

<i>Пархомец В. Н., Васильев А. Н.</i> Захват [^3H]дофамина препаратами синапсом головного мозга кроликов в динамике экспериментальной черепно-мозговой травмы	635
<i>Рева А. Д., Кузьменко Е. А., Черная В. П.</i> Влияние глутатиона на активность катепсинав головного мозга	636
<i>Сергеева С. С.</i> Убакинзаксисное дыхание нейрона в норме и при длительном синаптическом раздражении	637

CONTENTS

<i>Sokolova N. E., Tarunova N. P., Voronina T. A., Nerovkova L. N., Markina N. V.</i> Neurochemical and Neurophysiological Effects of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine in Normal Rats and Rats with Sleep Disturbances	483
<i>Solomonik R. O., Kondratiev A. D., Maderspach K.</i> Study of the Effect of Biogenic Amines on Glycoprotein Synthesis in Neuronal Culture from Chick Embryo Brain	493
<i>Haroutunian A. V., Mosesyan N. O., Burnasyan L. B., Eranyan S. S., Gevorgyan G. A.</i> ADP-ribosylation in Synaptic Membranes of Rat Brain	500
<i>Zharikova A. D., Zharikov S. I., Budantsev A. Yu., Chernyavskaya L.</i> Functional Activity of L-Glutamate Transport System After Modification of Synaptosomal Membranes by Oleic Acid	509
<i>Guloyan A. A., Barkhudaryan N. A., Valko K., Zakaryan T. R.</i> Purification and Characterization of Hypothalamic Coronar-constrictory Peptide Factors	518
<i>Popova N. K., Voltenko N. N., Kolpakov V. G., Alekhina T. A.</i> Some Characteristics of Brain Monoamine Oxidase in Rats with Genetic Predisposition to Catalepsy	525
<i>Srapionyan R. M., Abelyan Zh. G., Rostomyan M. A., Gabrielyan Zh. G., Bochkov I. F.</i> Radioimmunological Studies of the Cardioactive Protein-Hormone Complex from Hypothalamus	532
<i>Khvatova E. M., Koryagin A. S.</i> Catalytical and Regulatory Properties of Brain Mitochondrial H^+ -ATPase	538
<i>Krasnova T. I., Grigor'eva G. M., Khovanskikh A. E., Lezhneva I. P.</i> Interaction of Cholinesterase from Brain of the Cabbage Fly <i>Delia brassicae</i> with Cationic Ligands	546
<i>Oganesyan V. S., Badalyan L. L., Bedzhunyan K. D.</i> The Role of Triiodo-L-tyrosine in Coordination of Modulators of the Soluble Phosphate Dependent Brain Glutaminase	558
<i>Nazaryan K. B., Egoryan R. U., Kazaryan B. A.</i> Purification and Characteristics of Phosphoglyceromutase from Cattle Brain	566
<i>Efimova M. G., Ostapenko I. A., Brailovskaya I. V., Etingof R. N.</i> Changes of Lipid Peroxidation During Hereditary Retinal Degeneration	574

Short Communications

<i>Malikov U. M., Doemla N. N.</i> Serotonin Metabolism in Rat Brain under REM-Sleep Deprivation	584
<i>Meerson F. Z., Dmitriev A. D., Pshennikova M. G., Orlova E. Kh., Rozhitskaya I. I.</i> The Effect of Preadaptation to Physical Exercise on the Level of Immunoreactive Leu-Enkephalin in the Cerebral Cortex During Stress	588
<i>Abdovakhobov A. A., Grigor'eva G. M., Tilyabev Z.</i> Methylsulfomethylates of O-Alkyl-S-(β -Ethylmercaptoethyl) Methylthiophosphonates as Effectors for Studying Cholinesterases of Different Origin	592
<i>Karagezyan K. G., Oveyan A. A., Ovsepyan L. M., Sukiasyan L. V.</i> Changes of Rat Brain Phospholipids and Their Fatty Acid Composition under the Conditions of Unilateral Gangliosympathectomy	597
<i>Uvarova T. A., Kuznetsova T. V.</i> Proteins of Brain Subcellular Fractions of Rats Exposed to Hypoxia in Early Ontogenesis	602

<i>Zinyatkin S. M., Lindraz K. O.</i> Aldehyde-Dehydrogenase from Various Brain Regions of Rats Differing in Preference or Tolerance to Alcohol . . .	607
---	-----

Reviews

<i>Rozanov V. A.</i> Mechanisms of Regulation of the GABA Shunt in Brain . . .	611
--	-----

Chronicles

<i>Popova N. K.</i> "Transmitters and Behaviour" The National Conference . . .	629
<i>Borkhudaryan N. N.</i> Meeting of the Neurochemistry Section (June 10 th. 1988, Yerevan) . . .	632

Summaries of manuscripts presented for deposition in All-Union Institute of Scientific and Technical Information

<i>Parkhomets V. P., Vasiliev A. N.</i> Uptake of ³ H-dopamine by Isolated Synaptosomes from Rabbit Brain after an Experimental Cerebral Trauma . . .	635
<i>Reva A. D., Kuz'menko E. A., Chernaya V. I.</i> The Effect of Glutathione on the Activity of Brain Cathepsins . . .	636
<i>Sergeeva S. S.</i> Oubain-dependent Respiration of the Neuron in the Norm and after Long-term Synaptic Stimulation . . .	637