



УДК 612.82:571.1

ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ПСИХО- И НЕЙРОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА КИНЕТИКУ БИОСИНТЕЗА ЯДЕРНЫХ ГЛИКОПРОТЕИНОВ НЕЙРОНОВ

САИТМУРАТОВА О. Х., РУСТАМОВА Ф. Н.,
САДЫКОВ А. А., ЛЕОНТЬЕВ В. Б.

Институт биоорганической химии АН УзССР, Ташкент

Изучено действие психо- и нейротропных препаратов—хлорпромазина, стрихнина, кокаина и яда кобры на кинетику включения DL-[^{14}C] лизина в белки, синтезируемые ядрами нейрональных клеток головного мозга кроликов. Показаны количественные изменения в кинетике белоксинтезирующей активности ядер при кратковременном и долговременном действии исследуемых препаратов. Выявлено их влияние на соотношение скорости быстрых и медленных процессов синтеза низко- и высокомолекулярных фракций нейрональных ядерных гликопротеинов.

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о связи процесса обучения у животных с увеличением синтеза в нейронах мРНК и белков. Показано, в частности, что такой мощный ингибитор белкового синтеза, как пуромизин, затрудняет обучение [1].

Одни авторы придают основное значение в механизмах обучения и памяти мембранным процессам облегчения нервной передачи и привыкания, другие рассматривают в качестве химической основы памяти молекулярный код [2]. Открытие пептидных гормонов и либеринов, синтезируемых в нейронах, дало основание полагать существование зависимости формирования долговременной памяти от синтеза специфических аминокислотных последовательностей в определенных нейронах. Несомненно участие белоксинтезирующей системы ядер нейрональных клеток в образовании промежуточных консолидантов продолжительных форм памяти [3].

Однако в активации ядерного синтеза белков большое значение имеет функциональное состояние ядерных мембран нейронов и их способность к передаче сигнала непосредственно на генетический аппарат ядра. В связи с этим исследование действия нейротропных препаратов как инструментов регуляции формирования различных форм памяти приобретает большую актуальность.

Влияние нейротропных препаратов на эффективность синаптической передачи достаточно широко изучено; его связывают с конкурентным

взаимодействием с рецепторами синаптических мембран [4]. Однако действие психо- и нейротропных препаратов на состояние ядерных мембран и сопряженный с ними ядерный белковый синтез представляют особый интерес.

Изучение кинетических зависимостей белоксинтезирующей активности ядер нейрональных клеток при воздействии некоторых известных психо- и нейротропных препаратов—хлорпромазина, стрихнина, кокаина и яда кобры и является целью настоящей работы.

Материалы и методы

Работа проведена на месячных кроликах от одного помета. Из психо- и нейротропных препаратов использовали хлорпромазин, токсичность $LD_{50}=20$ мг/кг веса животных; стрихнин, $LD_{50}=0,9$ мг/кг; кокаин, $LD_{50}=0,2$ г/кг; яд кобры, $LD_{50}=0,1$ мг/кг веса животных. Вводимые концентрации препаратов: хлорпромазин— $1,4$ мг/кг $\approx 1/14$ LD; стрихнин— $0,2$ и $0,4$ мг/кг $\approx 1/2$ LD; кокаин 20 мг/кг $\approx 1/10$ LD и 8 мг/кг $\approx 1/25$ LD; яд кобры— $0,1$ мг/кг. Все препараты растворяли в физиологическом растворе, вводили животным в ушные вены и декапитировали их через 15 мин и 18 ч. Головной мозг извлекали сразу после забоя, ополаскивали холодным раствором $0,9\%$ -ного NaCl, очищали от оболочек и крови и подсушивали фильтровальной бумагой. Нейрональные клетки коры головного мозга тщательно отделяли от глияльных клеток методом микродиссекции и размельчали вручную в гомогенизаторе с раствором «А», содержащим $0,32$ M сахарозы, $0,003$ M $MgCl_2$ и $0,001$ M K_2HPO_4 , pH $7,4$. Ядра из полученного клеточного гомогената выделяли по методу Lovtrup-Rein [5] центрифугированием в градиенте плотности сахарозы на ультрацентрифуге фирмы «Beckman» (США), с ротором SW-27 при $78000g$ 60 мин.

Надосадочную жидкость сливали, фракции, содержащие ядра нейронов, промывали раствором «А» и суспендировали в $0,25$ M натрий-фосфатном буфере, pH $7,4$. Все процедуры по выделению ядер проводили при 4° . Чистоту и целостность выделенных ядер проверяли микроскопически.

Белоксинтезирующую активность (БСА) в изолированных нейрональных ядрах исследовали по скорости включения DL- $[^{14}C]$ лизина [6]. Инкубацию проводили в течение 60 мин при 37° на качающейся водяной бане. Для этого $0,5$ мл ядерной суспензии в $0,25$ M растворе натрий-фосфатного буфера (pH $7,4$) инкубировали в среде, состоящей из $0,4$ мл ($0,1$ M глюкозы, 25 mM $MgCl_2$, 65 mM NaCl, $0,1$ мл 2 mM $CaCl_2$) и $[^{14}C]$ лизина с У.А. 225 мк/г; для каждого опыта использовали $1 \cdot 10^5$ имп/мин. Кинетику БСА изучали по включению $[^{14}C]$ лизина на протяжении 15 , 30 , 45 и 60 мин инкубационного времени. В контрольные пробы добавляли ТХУ сразу после внесения метки. Инкубацию прекращали добавлением к реакционной смеси 2 мл 20% -ной ТХУ, смесь оставляли на холоду в течение 30 мин и затем

центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин. Полученный осадок ядерных гликопротеинов промывали на миллипоровом фильтре («Супрот», ЧССР) 100 мл 5%-ной ТХУ, затем этиловым спиртом и высушивали на воздухе. Радиоактивность продукта определяли в 10 мл сцинтилляционной жидкости ЖС-8 на счетчике SL-230 фирмы «Бекман» (США). Статистическая обработка результатов показала достоверность ($p < 0,05$). Белок определяли по Lowry и соавт. [7].

Результаты и обсуждение

Ранее было установлено, что в ядрах нейронов головного мозга кроликов *in vitro* синтезируются гликопротеины, состав которых изучен методами ЯМР и ТСХ [8]. Микроскопические исследования показали, что полученные вышеописанным методом ядра нейронов для изучения синтеза белка *in vitro* достаточно чисты и целостны.

Кинетику белкового синтеза в ядрах нейрональных клеток исследовали по включению [^{14}C] лизина через 15, 30, 45 и 60 мин. Часовая кинетика имеет двухступенчатый характер, что свидетельствует о двухфазности процесса с наблюдением четкого времени разделения (рис. 1). Очевидно, что первая ступень синтеза завершается на 30—45-й мин, а вторая выходит на плато на 60—75-й мин. По кинетике наблюдается разделение биосинтеза ядерных белков на относительно быстрые и более медленные синтетические процессы.

Фракционирование радиоактивного продукта на сефадексе G-50 (аммоний-ацетатный буфер, рН 6,06) приводило к разделению на 2 четких пика радиоактивности, которые соответствовали низкомолекулярной фракции (НМФ) с $M_r \approx 10-15$ кД и высокомолекулярной фракции (ВМФ) с $M_r \approx 25-30$ кД. Наблюдаемый фракционный состав гликопротеинов подтвердил кинетически выраженную тенденцию к двухступенчатому синтезу сначала НМФ, затем ВМФ гликопротеидов, содержание и соотношение которых резко изменяются с возрастом животных [9]. У молодых животных преобладает ВМФ, у зрелых животных соотношение двух фракций примерно равное. У старых животных содержание ВМФ резко уменьшается. При их внутрибрюшинном введении у животных увеличивается спонтанная двигательная активность и усложняются поведенческие реакции. Вышеизложенные факты свидетельствуют о специфичности синтеза и функции этих двух фракций.

На рис. 2—3 представлены данные исследования кинетики включения [^{14}C] лизина в ядра нейронов головного мозга кроликов при воздействии известных психо- и нейротропных препаратов: хлорпромазина, стрихнина, кокаина и яда кобры. Кратковременные эффекты воздействия препаратов на БСА ядер наблюдали через 15 мин после введения, а более продолжительное—через 18 ч. Исследование кинетики БСА ядер нейронов, выделенных через 15 мин после введения испытанных препаратов, показало резкое снижение скорости синтеза ядерно-

го белка по сравнению с контролем через час после инкубации с меткой (рис. 2, а).

Долговременное действие препаратов на кинетику БСА—через 18 ч после их введения—проявилось в снижении скорости синтеза, но не столь сильно как при кратковременном воздействии (рис. 2, б).

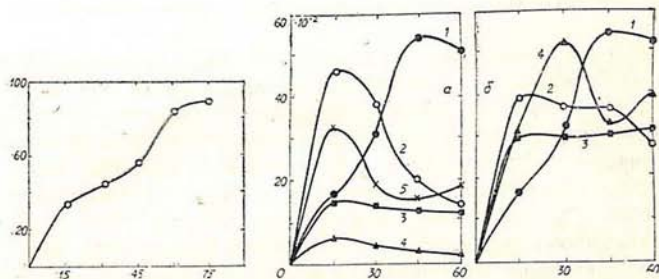


Рис. 1. Кинетика включения DL-[¹⁴C] лизина ядрами нейронов головного мозга кроликов. По оси ординат—процент включения [¹⁴C] лизина в ядерные гликопротеины. По оси абсцисс—время инкубации в мин

Рис. 2. Кинетика биосинтеза ядерных белков в нейрональных клетках контрольных и подопытных животных через 15 мин (а) и 18 ч (б) после введения препаратов: 1—контроль; 0,9%-ный NaCl; 2—яд кобры; 0,1 мг/кг веса; 3—хлорпромазин 1,4 мг/кг; 4—стрихнин 0,4 мг/кг; 5—кокаин 8 мг/кг. По оси ординат—радиоактивность имп/мин/мг ядерного белка. По оси абсцисс—время инкубации в мин

Действие испытуемых препаратов на кинетику БСА лучше прослеживается при анализе дифференциальных графиков изменения динамики включения [¹⁴C] лизина в ядерный синтез по сравнению с контролем (рис. 3, 4, 5).

Из кинетического анализа дифференциальных показателей включения [¹⁴C] лизина в ядерные белки во времени очевидно сходство действия хлорпромазина и яда кобры на кинетику БСА нейрональных ядер. Действие изученных препаратов через 15 мин после введения показало активацию быстрых процессов (15 мин инкубации) и резкое торможение медленных процессов по сравнению с контролем (рис. 3).

Долговременный эффект этих препаратов проявляется в относительном снижении интенсивности быстрых и активации медленных процессов по сравнению с кратковременным действием препаратов (15 мин). Визуальное наблюдение за поведением животных показало сильное возбуждение во время их введения, последующую нормализацию к 15-й мин и затем даже затормаживание двигательной активности. По-видимому, торможение стадии медленных процессов со снижением скорости синтеза и общей концентрации ВМФ ослабляет двигательную и эмоциональную активность животных, что свидетельствует о снижении уровня информации, кодируемой в устойчивые консолидаты памяти.

Концентрация высокомолекулярных белков под действием нейро-

лептика хлорпромазина и компонентов яда кобры снижается за счет интенсификации синтеза низкомолекулярной фракции. При этом со временем происходит снижение как интенсивности быстрых процессов, так и ослабление торможения медленных. Вышеуказанный факт свидетельствует о наличии динамического равновесия НМФ и ВМФ и баланса скоростей быстрых и медленных процессов в ядрах нейрональных клеток.

Действие нейротропных препаратов—стрихнина и кокаина на кинетику БСА отличается от действия предыдущих препаратов, но сходно между собой. Кратковременное последствие препаратов—через 15 мин после введения проявляется в значительном торможении стадии медленных процессов. Причем, если стрихнин в малой дозе (0,2 мг/кг) подавляет только медленные процессы, то в удвоенной дозе (0,4 мг/кг) тормозит и быстрые, и медленные процессы (рис. 4). Через 18 ч после введения препаратов наблюдается изменение баланса этих двух процессов: торможение медленных процессов ослабляется, но уже за счет стимуляции быстрых (рис. 4, 5). В этом случае также проявляется перераспределение соотношения скоростей из-за наличия динамического баланса в синтезе двух фракций. Здесь наблюдается проявление обратной связи между изменениями скоростей эндогенного синтеза ядерных белков и состоянием пусковых механизмов в мембранных комплексах, индуцирующих его в ядре.

Введение стрихнина и кокаина в ушную вену животных в малой дозе вызывает немедленное торможение двигательной активности. При введении кокаина в дозе 8 мг/кг ($1/25 LD_{50}$) наблюдается опрокидывание животных лапками вверх, остановка зрачков, а через 15 мин оживление и затем активация с возбуждением движений. Повышение дозы кокаина в 2,5 раза (20 мг/кг) приводит к шоку и гибели животных. Следовательно, полное торможение биосинтеза ядерных белков, соответствующее ареактивности ядерной мембраны и патологическому дефициту информации для ядерных компонентов, губительно для клетки и организма в целом. Продолжительное воздействие кокаина и стрихнина в течение 18 ч проявляется в активации двигательной активности, которой соответствует по кинетике БСА увеличение скоростей синтеза НМФ на стадии быстрых процессов относительно контроля.

Таким образом, изучение кинетических закономерностей функциональной активности ядер нейрональных клеток под влиянием известных психо- и нейротропных препаратов может прояснить многие аспекты процесса передачи информации с ядерной мембраны и кодирования ее в генетическом аппарате нейрональной клетки [3].

Активность БСА ядра отражает реактивное состояние ядерной мембраны. Взаимодействие исследуемых препаратов с рецепторами синаптических мембран (стрихнина с рецепторами глицина [10], хлорпромазина с рецепторами ацетилхолина [11]) может либо повысить концентрацию непеptидных медиаторов (циклических нуклеотидов), либо снизить ее, что и отражается на реактивности ядерной мембраны.

Поскольку итоговым эффектом действия хлорпромазина на кинетику БСА является снижение активности медленных процессов синтеза ВМФ гликопротеидов, становится понятным его нейролептическое действие, снижающее эмоциональное и моторное возбуждение.

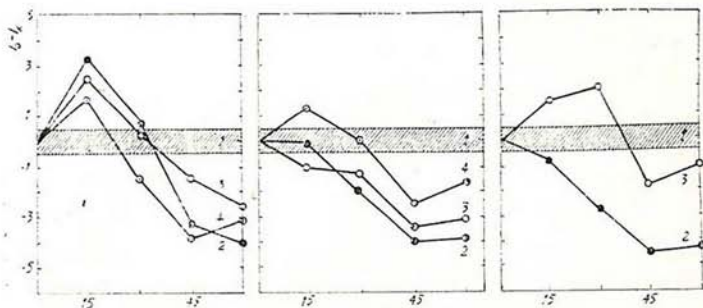


Рис. 3. Кинетика измерений дифференциальных величин радиоактивности (относительно контроля) при действии хлорпромазина и яда кобры на белоксинтезирующую активность ядер нейроглиальных клеток: 1—контроль; 2—яд кобры через 15 мин; 3—яд кобры через 18 ч; 4—хлорпромазин через 15 мин. Здесь и на рис. 4, 5 по оси ординат—дифференциальная радиоактивность $\Delta I = I_0 - I_k$, по оси абсцисс—время инкубации в мин

Рис. 4. Кинетика изменений дифференциальных величин радиоактивности (относительно контроля) при действии стрихнина на белоксинтезирующую активность ядер нейрональных клеток: 1—контроль; 2—доза 0,4 мг/кг через 15 мин; 3—доза 0,2 мг/кг через 15 мин; 4—доза 0,4 мг/кг через 18 ч

Рис. 5. Кинетика изменений дифференциальных величин радиоактивности (относительно контроля) при действии кокаина (8 мг/кг) на белоксинтезирующую активность ядер нейрональных клеток: 1—контроль; 2—через 15 мин; 3—через 18 ч

Для стрихнина и кокаина очевиден обратный эффект: сначала торможение, а затем активация синтеза НМФ, которые впоследствии могут обусловить и большой поток кодирования информации, облегчая обучение и ускоряя формирование памяти, что хорошо известно для малых доз стрихнина [10]. Очевидно, что выполненные исследования не охватывают весь диапазон доз исследованных препаратов, чтобы делать широкие выводы. Однако уже полученные результаты свидетельствуют о несомненной значимости белоксинтезирующей системы ядер нейрональных клеток в цепи передачи и кодирования информации в память.

Исходя из полученных результатов можно сделать предположение об определяющей роли скорости синтеза и общей концентрации ВМФ гликопротеидов ядра в нормальном функционировании ядерного аппарата. По-видимому, чрезмерные скорости синтеза и высокая концентрация ВМФ обуславливают формирование «патологической» сверх-

устойчивой памяти, что характерно для некоторых форм шизофрении [12]. Применение инсулинокоматозной терапии, способствующей распаду углеводной части гликопротеидов мозга является одним из широко распространенных приемов лечения [13], однако она не устраняет извращенную реактивность и повышенную чувствительность ядерных мембран мозговых нейронов, неадекватно интенсивно отвечающих синтезом ВМФ на один и тот же мембранный стимул.

В настоящей работе мы хотим обратить внимание на существование в ядре не только динамического баланса быстрых и медленных процессов синтеза гликопротеидов, но и оптимальных уровней их синтеза, обеспечивающих нормальное функционирование ядерного аппарата. Всякое отклонение от оптимума в синтезе НМФ и ВМФ может граничить с патологией—либо чрезмерным возбуждением в силу избытка информации, либо функциональным торможением из-за дефицита необходимой информации. Эти отклонения обусловлены, в первую очередь, реактивностью ядерной мембраны—повышенной или заниженной. Повышенная реактивность и чувствительность ядерной мембраны может определяться высокой интенсивностью синтеза НМФ и ВМФ в ответ на стандартный стимул, выраженный, например, уровнем цитоплазматических мессенджеров сАМР—сGMP.

Таким образом, действие психо- и нейротропных препаратов проявляется в модуляции реактивности ядерной мембраны, что отражается в кинетике БСА и соотношении скоростей быстрых и медленных процессов синтеза НМФ и ВМФ ядерных гликопротеинов.

EFFECT OF SOME PSYCHO AND NEUROTROPIC PREPARATIONS UPON KINETICS OF NUCLEAR GLYCOPEPTIDES BIOSYNTHESIS WITHIN NEURON

SAITMURATOVA O. H., RUSTAMOVA F. N., SADYKOV A. A.,
LEONTJEV V. B.

Institute of Bioorganic Chemistry of Uzbek Academy of Sciences,
Tashkent

The influence of neuro and psychotropic preparations namely chlorpromazine, strychnine, cocaine and cobra venom upon kinetics of ^{14}C -lysine incorporation into proteins, synthesized by rabbit cerebral neuronal cells nuclei has been studied. In short- and long-term effect of the preparations mentioned the qualitative changes in protein synthesizing nuclei activity kinetics are shown. The influence of neurotic preparations upon the ratio of rapid and slow synthesis processes of neuronal nuclear low- and high- M_r glycopeptide fractions has been found.

ЛИТЕРАТУРА

1. Caplan R., Cheung S. C-Y., Omenn G. S. J. Neurochem., v. 22, p. 517—520, 1974.

2. Мейлер Д. Биохимия, т. 3, с. 351, 1980.
3. Ашмерин И. П.—В сб.: Фармакология нейропептидов, с. 102—111, Москва, ВИНТИ, 1982.
4. Лаврецкая Э. Ф. Фармакологическая регуляция психических процессов, М., Наука, 1985.
5. Lovtrup-Rein H., McEwen B. C. J. Cell. Biol., v. 30, № 2, p. 405—415, 1966.
6. Lovtrup-Rein H. Brain Res., v. 19, № 3, p. 493—514, 1970.
7. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. K., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
8. Саитмуратова О. Х., Алимходжасва Г., Леонтьев В. Б., Леконцева В. К. Химия природн. соедин., № 4, с. 514—515, 1982.
9. Саитмуратова О. Х., Ахмедова Д., Рашидходжасва Г., Леонтьев В. Б. Узб. биол. журн., № 6, с. 67—69, 1979.
10. Красевский А. А. Биоорг. химия, т. 4, № 7, с. 853—878, 1978.
11. Подгораков А. П. Физико-химические свойства производных феноксиазина и их связь с фармакологическим действием. Автореферат канд. дисс., Москва, 1984.
12. Банщиков В. М., Леви В. Э.—В кн.: Терапия психических заболеваний, с. 191, Медгиз, 1961.
13. Чуприков А. П., Линев А. Н., Ковалева Р. И. Тезисы докл. Всесоюзн. симпозиума «Нейрохимические механизмы регуляции памяти», с. 111, Пушкино, 1984.

Поступила 20. VIII 1986