

том 7, № 3, 1988

ISSN 0203-493X

НЕЙРОХИМИЯ

ՆԵՅՆՈՒՄԻԱ



АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

АКАДЕМИЯ НАУК СССР
АКАДЕМИЯ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР.

НЕЙРОХИМИЯ ՆԵՅՐՈՔԻՄԻԱ

ТОМ 7, ВЫП. 3
ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ

Журнал основан в 1982 году
Выходит 4 раза в год

ИЗДАТЕЛЬСТВО АН АРМЯНСКОЙ ССР
ЕРЕВАН 1988

От. редактор *Э. А. Хачатурова*
Лит. сотрудник *Г. Р. Григорян*
Тех. редактор *Л. А. Азизбекян*

Сдано в набор 24.06.1988 г. Подписано к печати 3.10.1988 г. ВФ 05664.
Бумага № 1,70×108¹/₁₆. Высокая печать, п. л. 10,25÷3 вкл. Усл. печ. лист. 14,58.
Учет.-над. 11.44. Тираж 720. Заказ 456. Издат. 7444.
Адрес редакции: 375044, Ереван-44, ул. П. Севака 5/1, т. 28-17-70, 28-16-52
Издательство АН АрмССР, Ереван. 375019, пр. Маршала Баграмяна, 24 с.
Типография Издательства Академии наук АрмССР, Ереван-19,
пр. Маршала Баграмяна, 24.

Редакционная коллегия

А. А. ГАЛОЯН—главный редактор

Г. В. АПРИКЯН, А. В. АРУТЮНЯН (зам. главного редактора),
Л. 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, Л. Я. ТЯЖЕПЫЛД,
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, Л. С. ЧЕРКАСОВА, Р. Н. ЭТИНГОВ

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 трансмиттеров 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 615.214.2.015.4:612.822.1.014.467

ВЛИЯНИЕ L-3,4-ДИОКСИФЕНИЛАЛАНИНА НА ГИДРОКСИЛИРОВАНИЕ ТИРОЗИНА И СОДЕРЖАНИЕ БИОГЕННЫХ АМИНОВ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ В СИНАПСОСОМАХ ПОЛОСАТОГО ТЕЛА МОЗГА КРЫС

ШЕМАНОВ А. Ю., МИРОШНИЧЕНКО И. И., КУДРИН В. С., РАЕВСКИЙ К. С.
Институт фармакологии АМН СССР, Москва

Показано, что мадопар (L-ДОФА: бенсеразид—4:1) при системном введении крысам вызывал угнетение гидроксилирования тирозина, а также уменьшение относительного ингибиторного эффекта дофамина (ДА) на скорость данной реакции и увеличение уровней L-ДОФА, ДА, 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) в синапсосомах, полученных из полосатого тела мозга. Содержание гомованилиновой кислоты (ГВК), норадреналина (НА), 5-окситриптамина (5-ОТ) и 5-оксиндолуксусной кислоты (5-ОИУК) не изменялось. Предполагается, что угнетение гидроксилирования тирозина в синапсосомах мозга крыс, получающих мадопар, объясняется повышением концентрации ДА в микроокружении фермента тирозингидроксилазы. Рассматривается возможная роль увеличения содержания ДА в синапсосомах мозга крыс, получающих мадопар, в механизме уменьшения относительного ингибиторного эффекта этого медиатора на гидроксилирование тирозина. Обсуждается проблема компартментации ДА в нервных окончаниях и механизмы регуляции активности тирозингидроксилазы мозга.

В настоящее время имеются данные, указывающие на существование функционально различных «пулов» резервирования ДА в пресинаптических нервных окончаниях ДА-ергических систем мозга животных. Наиболее признанным можно считать выделение пула хранения ДА (стабильного) и пула вновь синтезированного нейротрансмиттера (лабильного). Предполагается, что процесс высвобождения ДА, сопряженный с нервным импульсом, связан преимущественно именно с последним и зависит от скорости синтеза медиатора [1]. Различные психотропные вещества, как оказалось, неодинаковым образом влияют на содержание медиатора в различных пулах [2]. Имеются данные, указывающие на функциональные различия пулов ДА, синтезированного из различных предшественников L-ДОФА, тирозина, L-фенилаланина. Изучение компартментации ДА, синтезированного из различных его предшественников, имеет важное значение для выработки рациональной стратегии заместительной терапии при болезни Паркинсона, патогенез которой связывают с дефицитом ДА-ергической передачи в nigrostriatalной системе мозга [3]. Как известно, существенный прогресс в лечении этого заболевания был достигнут благодаря введению ДОФА, особенно в сочетании

с ингибиторами периферической декарбоксилазы ароматических аминокислот карбидопа и бенсеразидом [4]. Несмотря на то, что имеется значительное число работ, в которых изучались превращения экзогенного ДОФА [5], сведения о происходящих при этом изменениях биосинтеза ДА из тирозина практически отсутствуют. Между тем, такого рода данные могут прояснить некоторые аспекты компартментации ДА, синтезированного из различных предшественников и их роль в регуляции биосинтеза медиаторов. В связи с этим целью данной работы явилось изучение влияния ДОФА, вводимого системно в сочетании с бенсеразидом, на гидроксирование тирозина—ключевой этап биосинтеза ДА в мозгу крыс—и содержание биогенных аминов и некоторых их метаболитов в синапсосомах полосатого тела мозга этих животных.

Материалы и методы

Опыты проводили на белых крысах-самцах линии Wistar массой 220 ± 50 г. Крысам контрольной группы внутривенно вводили 0,9%-ный раствор хлорида натрия (с добавлением твина-21) из расчета 2 мл/кг. Животным опытной группы вводили суспензию мадопара с твином-21 в 0,9%-ном растворе хлорида натрия из расчета 125 или 250 мг/кг в том же объеме. Через 1 ч после инъекции крыс декапитировали. Коммерческий препарат «Мадопар» («Roche», Швейцария) представляет собой смесь L-ДОФА и бенсеразида в весовом отношении 4:1. Были выбраны дозы мадопара, вызывавшие отчетливые изменения в поведении крыс, наиболее выраженные через 1 ч после введения [6]. Использовали метод определения скорости гидроксирования меченного по тритию тирозина в синапсосомах (фракция P₂), являющийся модификацией методики Nagatsu и соавт. [7] и в основном соответствовавший процедуре, описанной нами ранее [8]. В данной работе были внесены следующие изменения: буфер инкубации не карбогенизировали; контролем на ферментативное образование меченой воды служили пробы, которые, как и опытные пробы, инкубировали 15 мин при 37°, но при этом синапсосомы вносили после инкубации непосредственно перед добавлением 400 мкл 3,5%-ной ТХУ. Для изменения радиоактивности использовали толуольный сцинтиллятор с тритоном X-100 [9]. Применяли 3,5-[³H]-L-тирозин со специфической активностью 1,85 Ки/ммоль (IZINTA, Венгрия).

Для определения содержания моноаминов в структурах мозга использовали методику ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Применяли хроматографию в обращенных фазах с ионопарным реагентом октисульфатом натрия (ОСН). Маточные растворы моноаминов и внутреннего стандарта 3,4-диоксибензиламина (ДОБА) с концентрацией 0,1 мг/мл готовили 2 раза в месяц в 0,1 н. HClO₄ с добавлением 1%-ного м-абисульфита натрия. Рабочие стандарты (100 нг/мл), необходимые для калибровки прибора, готовили ежедневно. Для определения катехоламинов и ДОФА использовали метод избирательного осаждения их на окиси алюминия в щелочной среде. 100 мкл синапсосомной фракции.

разбавляли 0,1 н. HClO_4 до 2 мл. Затем образцы центрифугировали при 10000 г в течение 5 мин. Осаждение на окиси алюминия проводили в градуированном пузырьке. Смесь содержала: 2 мл супернатанта, 2,5 мкл ДОБА, 50 мг Al_2O_3 и 1 мл трис- HCl буфера с 1,5 М ЭДТА, рН 8,6. После трехкратной промывки 2 мл бидистиллированной воды катехоламины и ДОФА элюировали с помощью 200 мкл 0,1 н. HClO_4 центрифугированием через целлюлозные фильтры (0,2 мкм) [10]. Для определения катехоламинов, 5-ОТ, 5-ОИУК, ДОФУК и ГВК к 100 мл синаптосомной смеси добавляли равное количество 0,2 н. HClO_4 , содержащей ДОБА (100 нг/мл). Затем образцы центрифугировали при 15000 г в течение 10 мин. Супернатант фильтровали центрифугированием в течение 2 мин через 0,2 мкм целлюлозные фильтры. 20 мкл чистого фильтрата наносили на колонку путем прямой инъекции [11]. Разделение изучаемых веществ проводили на хроматографе LC-304 T («BAS», США), снабженным инжектором 7125 Rheodyne (США) с 20 мкл петлей для нанесения образцов. Использовали колонку Biophase RP-18 октадецилсилановую 4,6 мм×250 мм, защищенную предколонкой RP-18 4,6 мм×30 мм, 20 мкм. Колонку термостатировали при 45°. В качестве детектора использовали двойной амперометрический детектор LC-4В с ячейками LC-17D и двумя параллельными стеклоуглеродными электродами TL-5. Потенциалы, приложенные к рабочим электродам, составляли +650 мВ и +850 мВ против Ag/AgCl электрода сравнения RE-1. Скорость потока—1 мл/мин. Для определения катехоламинов, 5-ОТ, 5-ОИУК, ДОФУК и ГВК использовали следующую подвижную фазу: маточные растворы 0,02 М лимонной кислоты и 0,02 М NaH_2PO_4 буфера, содержащего 0,269 мМ ЭДТА, смешивали в пропорции 2,4:1. Затем добавляли 0,3 мМ OCH и 40% ацетонитрила, рН 3,6-устанавливали добавлением фосфорной кислоты. Подвижную фазу фильтровали, используя вакуумный насос, через целлюлозные фильтры «Супрог» (0,25 мкм, СССР) [10]. Для определения катехоламинов и ДОФА в качестве подвижной фазы использовали 0,15 М буфер монохлоруксусной кислоты, содержащей 2 мМ $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ и 25—30 мг/л OCH , рН 3,0, которое устанавливали добавлением NaOH . Подвижную фазу также фильтровали [11].

Полученные данные статистически обрабатывали, используя критерий Стьюдента и U-критерий Манна-Уитни. При изучении изменения влияния ДА на гидроксילирование тирозина в синапсосмах под действием введения мадопара сравнивалась величина эффекта ДА, выраженная в % к соответствующему контролю.

Результаты и обсуждение

Эксперименты показали, что мадопар в дозах 125 и 250 мг/кг при внутрибрюшинном введении крысам вызывал угнетение гидроксילирования тирозина в синапсосмах полосатого тела мозга крыс на 30,6 и 35,9% соответственно (рис. 1). Как видно из этих данных, увеличение

дозы вещества в 2 раза в наших опытах практически не сказывалось на эффекте. В дальнейшем в экспериментах применяли дозу 125 мг/кг.

Известно, что процесс гидроксирования тирозина испытывает на себе многосторонний регуляторный контроль в ДА-ергических структурах мозга, причем одним из его эндогенных регуляторов является ДА, способный ингибировать этот процесс. Различные пулы ДА вносят, по-видимому, неодинаковый вклад в регуляцию биосинтеза медиатора [2]. В связи с этим, нами было изучено влияние ДА на скорость реакции в синапсосомах, выделенных из мозга контрольных и получавших мадопар крыс. Результаты этих опытов представлены на рис. 2, из которого следует, что скорость гидроксирования тирозина в синапсосомах из мозга контрольных крыс в присутствии 10^{-6} М ДА уменьшалась до $40,7 \pm 1,8\%$ от исходного уровня, принятого за 100%, в то время как в синапсосомах из мозга крыс, получавших мадопар, — лишь $54,2 \pm 2,5\%$ по отношению к соответствующему контролю. Таким образом, ДА вызывает менее выраженное относительное ингибирование реакции в синапсосомах из мозга животных, которым вводили мадопар, где скорость реакции была исходно снижена на 30% по сравнению с этим показателем для контрольных животных.

Введение экзогенного ДОФА, согласно литературным данным, вызывает увеличение содержания ДОФА, ДА, ДОФУК, ГВК в ДА-ергических нервных окончаниях. Однако в этих работах содержание ДОФА и его метаболитов определяли лишь непосредственно в тканях [5]. Поэтому представлялось интересным выяснить, сохраняются ли указанные изменения уровней этих веществ в синапсосомах. Кроме того, в наших опытах измеряли содержание в синапсосомах стриатума НА, 5-ОТ и его метаболита 5-ОИУК. Как можно видеть из рис. 3, синапсосомы полосатого тела мозга крыс, которым вводили мадопар, содержат значительно больше ДОФА, ДА и продукта его окислительного дезаминирования ДОФУК. В то же время содержание ГВК не изменялось, что, по-видимому, связано с преимущественно внесинапсосомным образованием этого метаболита, а также с более высокой, чем для ДОФУК, скоростью его вымывания из тканей [12]. Содержание НА в синапсосомах также не изменялось (рис. 3). Это согласуется с данными о том, что экзогенно введенный ДОФА в полосатом теле мозга крыс, по-видимому, не служит источником образования НА, во всяком случае в заметной степени [13]. Вопреки имеющимся сведениям о том, что ДОФА при инкубации с тканью, предварительно «нагруженной» [3 H]серотонином, способен усиливать высвобождение этого индоламина [14], в наших опытах изменение уровня 5-ОТ и его метаболита 5-ОИУК в синапсосомах было небольшим (рис. 3). Полученные данные позволяют предположить, что повышение под действием мадопара уровня ДА в синапсосомах является причиной угнетения гидроксирования тирозина. Это предположение, естественно, основано на том, что ДА, возрастание концентрации которого отмечается в синапсосомах, имеет доступ к ТГ. Считается, что часть этого фермента, равно как и декарбоксилаза ароматических аминокислот,

находится в растворенном состоянии в цитоплазме нервного окончания, где и протекают, по-видимому, главным образом реакции гидроксирования тирозина и декарбоксилирования ДОФА [1]. Вместе с тем имеются также данные, что значительная часть ТГ ассоциирована с наружной поверхностью мембраны синаптических везикул [15]. Некоторые авторы придают большое значение везикулярному пулу ДА в регуляции активности фермента [6], хотя имеются данные о том, что эта роль зависит

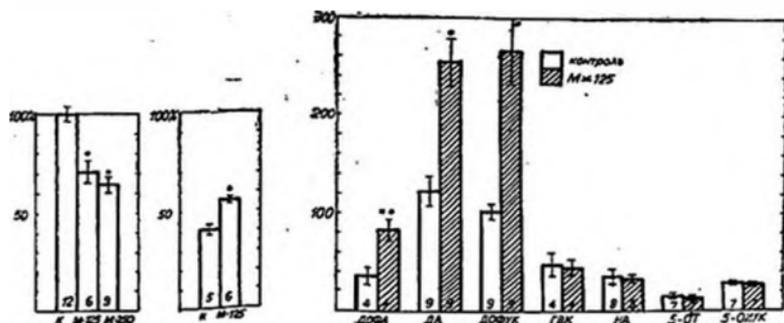


Рис. 1. Влияние системно вводимого мадопара на гидроксирование тирозина в синапсосамах полосатого тела. По оси ординат—скорость реакции в % к контролю (100% соответствует 2,43 пмоль/мин/мг белка). Здесь и на рис. 2, 3 цифры в столбиках—количество опытов. К—контроль, М-125—мадопар в дозе 125 мг/кг, М-250—мадопар в дозе 250 мг/кг. * $p < 0,01$ —уровень достоверности отличий от контроля (критерий Стьюдента)

Рис. 2. Влияние системно вводимого мадопара на ингибирование дофамином гидроксирования тирозина в синапсосамах полосатого тела. По оси ординат—скорость реакции в % по отношению к соответствующему контролю (никубированные в отсутствие дофамина синапсосы контрольных животных, получавших мадопар). 100% для синапсосом контрольных крыс соответствует скорости реакции 4,03 пмоль/мин/мг белка. 100% для синапсосом крыс, получавших мадопар, составляет $70 \pm 2,5\%$ от скорости реакции в синапсосах контрольных крыс в отсутствие дофамина. К—контроль, М-125—мадопар в дозе 125 мг/кг. * $p < 0,01$ —уровень достоверности отличия от эффекта дофамина в контроле (критерий Манна-Уитни)

Рис. 3. Влияние системно вводимого мадопара на содержание моноаминов и их метаболитов в синапсосамах полосатого тела (в пг/мг белка). * $p < 0,01$ и ** $p < 0,05$ —уровни достоверности отличий от контроля по критерию Манна-Уитни

от используемого предшественника биосинтеза ДА [3]. ДА, по-видимому, влияет на активность двумя способами—действуя через пресинаптические дофаминовые рецепторы и непосредственно ингибируя фермент [1]. Концентрация ДА в цитоплазме нервных окончаний, которая определяет степень прямого влияния ДА на фермент, зависит от протекания 4-х основных процессов. Увеличение концентрации ДА происходит, с одной стороны, благодаря постоянному биосинтезу ДА при участии соответствующих ферментов, а с другой стороны—благодаря обратному захвату

ДА из синаптической щели [17], уровень ДА в цитоплазме, в свою очередь, зависит от интенсивности высвобождения медиатора. Напротив, концентрация ДА в цитоплазме уменьшается благодаря захвату ДА синаптическими везикулами [16, 18], а также в результате энзиматического дезаминирования [17]. Таким образом, интенсивность первых двух процессов определяет увеличение ингибирующего влияния ДА на тирозингидроксилазу [17], в то время как депонирование ДА, а также его дезаминирование приводят к уменьшению концентрации ДА в микроокружении фермента, что выражается в повышении его активности [16, 17]. В последнее время появились работы, свидетельствующие о функциональной роли разобщенности пулов ДА, синтезируемого из различных предшественников, хотя механизм их разграничения в нервных окончаниях остается пока неясным [3]. По данным Melamed, Dafni [19], скорость синтеза и метаболизма ДА, образующегося из экзогенного ДОФА, не зависит от частоты импульсации в ДА-ергических нейронах в отличие от соответствующих показателей для ДА, синтезируемого из тирозина; по-видимому, местом накопления ДА, синтезируемого из ДОФА, является преимущественно функционально малоактивный пул. Однако, по нашим данным, синтез ДА из тирозина в условиях введения ДОФА уменьшен. Это, возможно, говорит об отсутствии четкой пространственной разобщенности различных пулов нейротрансмиттера друг от друга, что согласуется с данными об увеличении высвобождения ДА после введения ДОФА, хотя увеличение высвобождения ДА по некоторым данным не коррелирует с повышением уровня ДА в мозгу [20, 5]. Вопрос о том, каким образом и из каких терминалей в полосатом теле высвобождается ДА, синтезированный из ДОФА, остается в настоящее время не вполне ясным, хотя многочисленные факты свидетельствуют о значительной роли ДА-ергических, а не серотонин- или НА-ергических окончаний [5].

Суммируя результаты этой работы, попытаемся выделить наиболее вероятные, с нашей точки зрения, предположения и выводы, которые можно сделать на их основе. В синапсоммах мозга крыс, получавших мадопар, обнаружено повышение содержания ДОФА, ДА и ДОФУК, угнетение гидроксирования тирозина, а также уменьшение регуляторного действия ингибитора реакции ДА на этот процесс. Увеличение содержания ДА, по-видимому, происходит частично за счет накопления его в синаптических пузырьках нервных окончаний. ДА, содержащийся в них, вероятно, прямо не контактирует с ТГ, однако, находясь в динамическом равновесии с вневезикулярным ДА, может участвовать в регуляции фермента, в особенности той его фракции, которая ассоциирована с синаптическими везикулами [16]. Поэтому в условиях введения животным ДОФА можно ожидать повышения уровня ДА в цитоплазме, особенно если предположить, что при этом происходит насыщение синаптических везикул дофамином, следствием чего является замедление удаления ДА из цитоплазмы. Эти предположения нуждаются в экспериментальной проверке. С этим согласуется также и наблюдавшийся нами

факт уменьшения относительного ингибиторного эффекта на синаптосомы экзогенного ДА (рис. 2), при инкубации с которым посредством механизма обратного захвата, как можно предполагать, повышается уровень цитоплазматического ДА. Одним из объяснений этого факта может быть то, что ингибиторный эффект ДА при повышении его концентрации увеличивается логарифмически [21], при этом одинаковый прирост содержания ДА в цитоплазме будет приводить к ингибированию реакции в неодинаковой степени, тем меньшей, чем больше исходный уровень медиатора в микроокружении фермента, что, как уже говорилось, может иметь место в данном случае, факт угнетения гидроксирования тирозина после введения ДОФА, по-видимому, свидетельствует об отсутствии полной пространственной разобщенности пулов медиатора, синтезируемого из различных предшественников, что не исключает, однако, их функциональной разобщенности. В качестве ее возможного механизма, по-видимому, может служить ассоциация определенной части ТГ с синаптическими везикулами.

В целом, полученные в этой работе данные свидетельствуют о том, что изучение характеристик синаптосом, выделенных из мозга животных после введения ряда фармакологически активных веществ, может дать важную дополнительную информацию о происходящих в нервных окончаниях процессах, их физиологической регуляции, а также механизмах действия изучаемых веществ.

INFLUENCE OF L-3,4-DIHYDROXYPHENYLALANINE ON TYROSINE HYDROXYLATION AND CONTENT OF BIOGENIC AMINES AND THEIR METABOLITES IN RAT BRAIN STRIATAL SYNAPTOSOMES

SHEMANOV A. Yu., MIROSHNICHENKO I. I., KUDRIN V. S.,
RAYEVSKY K. S.

Institute of Pharmacology, the USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

After systemic administration, madopar (l-DOPA : benserazide—4 : 1) was shown to cause an inhibition of tyrosine hydroxylation, as well as a reduction of relative inhibitory effect of dopamine on the reaction velocity and an increase of levels l-DOPA, dopamine, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid in synaptosomes from brain striatum. The content of homovanilic acid, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindolacetic acid failed to be modified. The inhibition of tyrosine hydroxylation in brain synaptosomes of rats treated with madopar is suggested to be mediated by the increase of dopamine concentration in the closest surrounding of tyrosine hydroxylase. The possible role of increasing dopamine concentration in rat brain synaptosomes in the mechanism of decrease of relative inhibitory effect of the neurotransmitter on tyrosine hydroxylation is considered. The problem of dopamine compartmentation in nerve endings and the mechanisms of tyrosine hydroxylase activity regulation are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *McMillen B. A., German D. C., Shore P. A.* Biochem. Pharmacol. v. 29, p. 3045—3050, 1980.
2. *Bagchi S. P., Bagchi P., Smith T. M.* Brain Res., v. 187, p. 403—414, 1980.
3. *Bagchi S. P.* Neuropharmacology, v. 24, p. 37—41, 1985.
4. *DaPrada M., Keller H. H., Pteri L., Kettler R., Haefely W. E.* Experientia, v. 40, p. 1165—1172, 1984.
5. *Hefft F., Melamed E.* Brain Res., v. 225, p. 333—346, 1981.
6. *Бондаренко Нина А., Бондаренко Н. А.* Фармакол. и токсикол., № 4, с. 31—34, 1985.
7. *Nagatsu T., Levitt M., Udenfriend S.* Analyt. Biochem., v. 9, p. 122—126, 1964.
8. *Шеманов А. Ю., Кудрин В. С., Раевский К. С.* Нейрохимия, т. 3, с. 227—235, 1984.
9. *Остерман Л. А.* Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радионуклидными методами, М., Наука, 1983.
10. *Bruntlett C. S.* Current Separations BAS, v. 2, № 2, 1980.
11. *Kontur P., Dawson P., Monjan A. J.* Neurosci. Meth., v. 11, p. 249—318, 1984.
12. *Westernik B. H. C., Korf J.* Eur. J. Pharmacol., v. 37, p. 249—255, 1976.
13. *Hefft F., Melamed E., Wurtman R. J.* J. Pharmacol. and exp. Ther., v. 183, p. 189—197, 1981.
14. *Ng L. K. I., Colburn R. W., Kopin I. J.* J. Pharmacol. and exp. Ther., v. 183, p. 316—325, 1972.
15. *Fahn S., Rodman J. S., Cote L. J.* J. Neurochem., v. 16, p. 1293—1300, 1969.
16. *McMillen B. A., Shore P. A., Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, v. 313, p. 39—44, 1980.
17. *Cerrito F., Ratterl M.* Eur. J. Pharmacol., v. 68, p. 465—470, 1980.
18. *Kuhr W. G., Ewing A. G., Near J. A., Wightman R. M.* J. Pharmacol. and exp. Ther., v. 232, p. 388—394, 1985.
19. *Melamed E., Dafni N.* J. Pharm. Pharmacol., v. 34, p. 820—822, 1982.
20. *Ponzo F., Achilli G., Perego G., Rinaldi G., Algeri S.* Brain Res., v. 273, p. 45—51, 1983.
21. *Compton D. R., Johnson K. M.* Eur. J. Pharmacol., v. 110, p. 157—162, 1985.
22. *Tsudzuki T.* J. Biochem., v. 89, p. 61—69, 1981.

Поступила 20. IV 1988



УДК 57.053:576.535

ВЛИЯНИЕ СЕРОТОНИНА НА ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ КЛЕТОК ФЕОХРОМОЦИТОМЫ РС12

ПОСЫПАНОВА Г. А., *ГОЛУБЕВА Е. Е., **КОНДРАТЬЕВ А. Д.,
СУВОРОВ Н. Н., СЕВЕРИН Е. С.

Институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова.

*Институт прикладной молекулярной биологии МЗ СССР.

**Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва

Исследовано влияние серотонина и некоторых его агонистов на морфологическую дифференцировку и пролиферативную активность клеток феохромоцитомы РС12. Показано, что под действием серотонина происходит индукция роста нейритов и снижение включения [³H]тимидина в ДНК клеток РС12. Исследованы параметры этих процессов. Обнаружено усиление эффекта серотонина фактором роста нервов. Показано отличие друг от друга механизмов индукции дифференцировки клеток РС12 серотонином, фактором роста нервов и соединениями, повышающими внутриклеточный уровень сАМР.

Клеточная линия РС12 была получена Greene и Tischler [1] путем клонирования опухолевых клеток крысиной феохромоцитомы, являющихся продуктом неопластической трансформации хромаффинных клеток паренхимы мозгового слоя надпочечников. В ходе эмбрионального развития хромаффинные клетки ведут свое происхождение из той же группы клеток, из которой впоследствии образуются ганглии симпатического брюшного сплетения [2]. Таким образом, РС12 являются клетками нейронального происхождения. Линия клеток РС12 стала удобной моделью для изучения дифференцировки симпатических нейронов. Под действием фактора роста нервов (ФРН) эти клетки, обычно круглые или полигональные, прекращают пролиферацию и принимают характерную для симпатического нейрона форму, образуя сеть разветвленных нейритов. Этот процесс сопровождается целым рядом биохимических изменений, характерных для развивающегося симпатического нейрона, таких как индукция биосинтеза АХЭ [3], появление электровозбудимости [4] и т. д. Механизм действия ФРН в настоящее время не ясен. Удобным подходом к его изучению является поиск соединений, способных имитировать действие ФРН на клетки-мишени. Недавно было показано, что ряд онкогенов (V-src, gas) способен стимулировать ФРН-подобную дифференцировку клеток РС12 [5, 6]. Индукция роста нейритов наблюдалась в

ряде случаев при повышении внутриклеточного уровня сАМР [7, 8], причем эффект был синергичен действию ФРН.

Целью исследования явилось изучение влияния нейромедиатора серотонина на пролиферативную активность клеток РС12 и их морфологическую дифференцировку. Ранее было показано, что клетки РС12 обладают высокоаффинной системой поглощения серотонина [9], однако длительное действие серотонина на эти клетки не было исследовано. В данной работе показано, что при длительной инкубации клеток РС12 с серотином наблюдается индукция морфологической дифференцировки и снижение интенсивности клеточной пролиферации.

Материалы и методы

Клетки феохромоцитомы РС12, субклонированные по повышенной адгезии к субстрату [10], культивировали на среде RPMI 1640, содержащей 7,5% термонактивированной лошадиной сыворотки («Flow»), 7,5% эмбриональной телячьей сыворотки («Serba»), 50 мкг/мл стрептомицина и 50 Ед/мл пенициллина в пластиковых культуральных флаконах площадью 75 см² («Greiner»). Клетки инкубировали при 37° в увлажненной атмосфере, содержащей 95% воздуха и 5% CO₂.

Для определения индекса клеток с нейритами, клетки снимали с субстрата, тщательно ресуспендировали и высевали с низкой плотностью (5—10×10³ клеток на мл) в 12-луночные платы («Flow»). При необходимости, после распластывания клеток по субстрату, среду с сывороткой удаляли, клетки промывали бессывороточной средой 3 раза по 10 мин и осуществляли дальнейшую инкубацию в среде без сыворотки. К клеткам стерильно добавляли фактор, тестируемый на нейритстимулирующую активность. После окончания инкубации среду удаляли, клетки промывали два раза солевым раствором Хэнкса и фиксировали 15 мин в смеси этанол-уксусная кислота (3:1). Подсчет клеток с нейритами проводили с помощью фазово-контрастной микроскопии при увеличении ×160. Число клеток с нейритами подсчитывали в 2—3 тысячах клеток с 5 препаратов и выражали в процентах. Фотографии клеток получали с помощью инвертированного микроскопа («Ortop») с применением дифференциально-интерференционного контраста при увеличении ×160.

Пролиферативную активность клеток РС12 определяли по модифицированному методу Rubin [11]. Клетки высевали в 24-луночные платы и инкубировали как описано выше. За 16 ч до окончания опыта (кроме специально оговоренных случаев) в среду вводили [³H]тимидин (20 Ки/ммоль) в конечной концентрации 1 мкКи/мл. После окончания инкубации среду удаляли, клетки промывали два раза солевым раствором Хэнкса, фиксировали 5%-ной ТХУ два раза (10 мин и 5 мин) при 4° и экстрагировали ДНК 0,6 мл 10% ТХУ в течение 2 ч при 70°. По 0,5 мл экстракта вносили во флаконы, содержащие по 5 мл диоксиданового сцинтиллятора и измеряли радиоактивность на жидкостном спектрометре «Intertechnique SL-30» (Франция).

Количество живых клеток определяли с помощью гемоцитометра в присутствии трипанового синего. ФРН выделяли из семенной плазмы быка по методу Кондратьева и соавт. [12]. Концентрацию белка определяли по методу Bradford [13].

Результаты и обсуждение

Влияние серотонина на морфологию клеток РС12 определяли, культивируя их на среде, содержащей сыворотку в течение 5 суток. Было обнаружено, что серотонин способен индуцировать рост нейритов у части клеток РС12. Морфология стимулированных серотонином клеток приведена на рис. 1 в сравнении с клетками, обработанными фактором роста нервов. Зависимость величины индекса клеток с нейритами (N_1) от времени инкубации с серотонином представлена на рис. 2. Из данных, приведенных на рис. 2, следует, что уже на 1-е сутки после добавления серотонина у части клеток (N_1 10,1%) появляются нейриты. К 5-м суткам величина N_1 достигает 40,5%, что близко к значению N_1 для клеток, обработанных ФРН в течение того же времени (N_1 56,7%). Ранее было показано, что рост нейритов у клеток РС12, культивируемых на среде

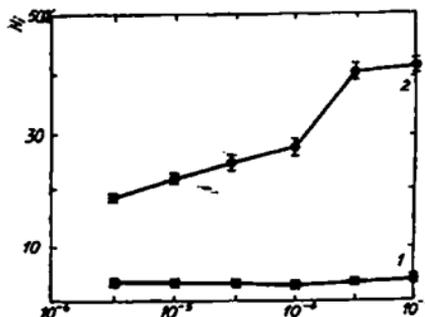
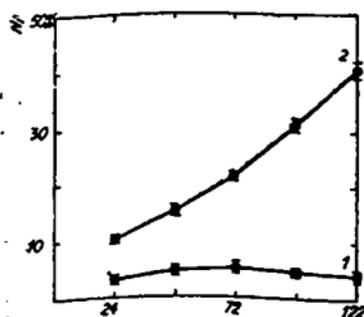


Рис. 2. Зависимость индекса клеток с нейритами (N_1 , %) от времени инкубации с серотонином. 1— N_1 в контрольной культуре; 2— N_1 в присутствии серотонина (0,5 мМ)

Рис. 3. Зависимость индекса клеток с нейритами (N_1 , %) от концентрации серотонина на 5-е сутки инкубации. 1— N_1 в контрольной культуре; 2— N_1 в присутствии серотонина

без сыворотки, индуцируется уже на 1-е сутки инкубации с ФРН, достигая величины N_1 около 40%. В случае серотонина, перевод клеток на бессывороточную среду не приводил к ускорению индукции роста нейритов или изменению характера временной зависимости, представленной на рис. 2. Совместное добавление серотонина (0,5 мМ) и ФРН (1,9 нМ) приводило к взаимному усилению эффекта (N_1 на 5-е сутки 73,5%) (рис. 1, 2). Индукция роста нейритов начинала детектироваться при кон-

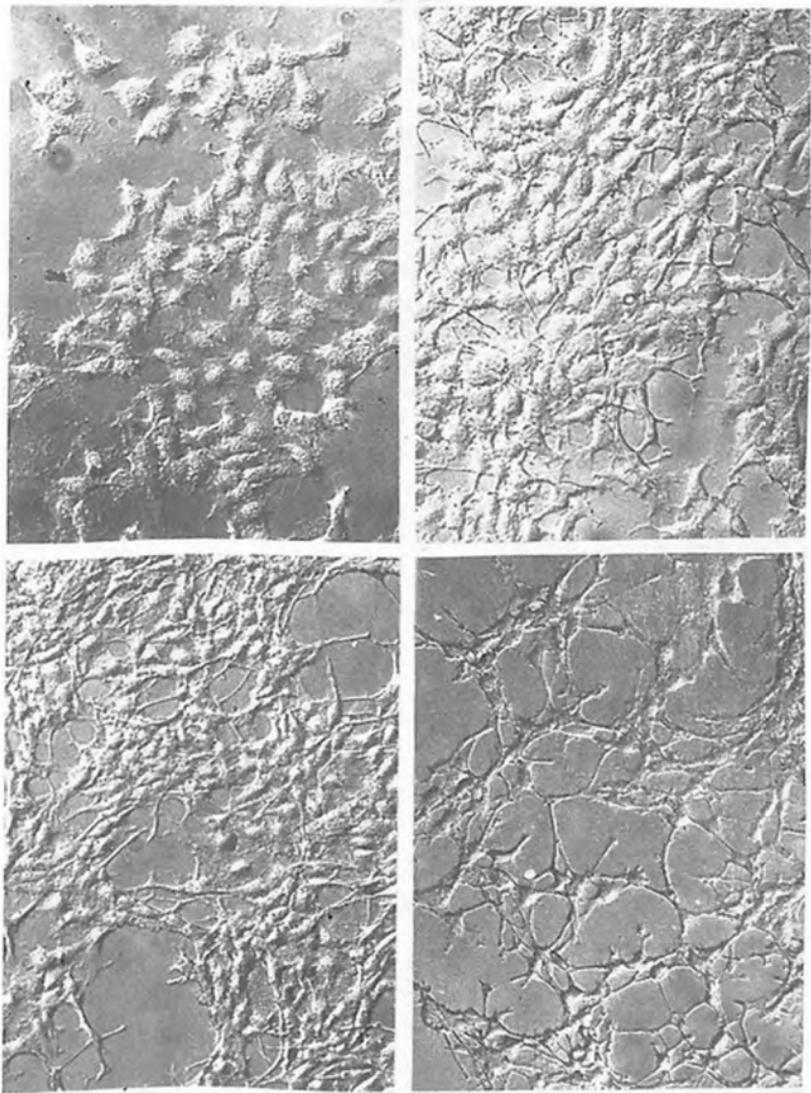


Рис. 1. Влияние серотонина и ФРН на морфологическую дифференцировку клеток РС 12 на 5-е сутки инкубации на среде с сывороткой. а—контрольная культура; б—в присутствии ФРН (1,9 мМ); в—в присутствии серотонина (0,5 мМ); г—в присутствии ФРН (1,9 мМ) и серотонина (0,5 мМ). Дифференциально-интерференционный контраст. Увеличение $\times 160$

центрации серотонина в культуральной среде, равной 5 мкМ (рис. 3) и достигала насыщения при концентрации 0,5 мМ.

Наряду с индукцией роста нейритов критерием степени дифференцировки клеток РС12 является снижение интенсивности их пролиферации. При добавлении серотонина к клеткам РС12 было обнаружено уменьшение включения [³H]тимидина в ДНК. Зависимость этого процесса от времени культивирования в присутствии серотонина (0,5 мМ) представлена на рис. 4. Из данных, приведенных на рис. 4, видно, что эффект серотонина заметен уже в течение 1-х суток, что совпадает по времени с индукцией роста нейритов. Отмеченной ранее стимуляции пролиферации фактором роста нервов в течение первых суток инкубации [14] в случае серотонина не наблюдалось. Заметное снижение включения [³H]тимидина в ДНК на 5-е сутки происходило при концентрации серотонина 50 мкМ (рис. 5), в то время как рост нейритов индуцировался при концентрации 5 мкМ (рис. 3).

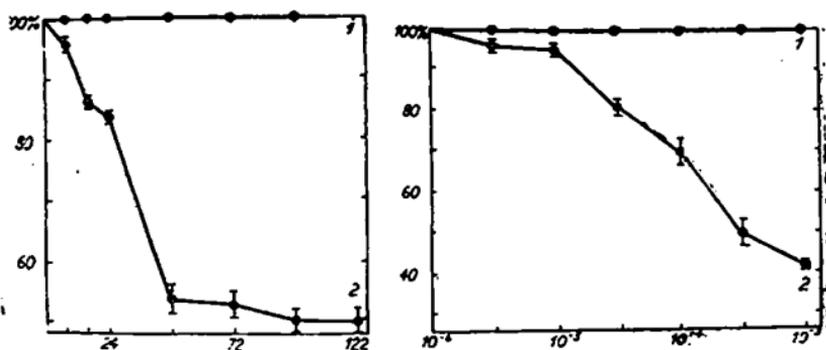


Рис. 4. Зависимость величины включения [³H]тимидина (в %) клетками РС12 от времени инкубации с серотонином. 1—уровень в контрольной культуре; 2—уровень в присутствии серотонина (0,5 мМ)

Рис. 5. Зависимость величины включения [³H]тимидина (в %) клетками РС12 от концентрации серотонина на 5-е сутки инкубации. 1—уровень в контрольной культуре (100%); 2—уровень в присутствии серотонина

Для определения специфичности влияния серотонина на индукцию дифференцировки клеток РС12 был исследован эффект ряда агонистов серотонина, а также других индолсодержащих соединений (таблица). Из данных, представленных в таблице, следует, что все указанные соединения обладают способностью снижать включение [³H]тимидина в ДНК клеток РС12. Определенный по окрашиванию клеток трипановым синим значительный цитотоксический эффект агонистов серотонина (триптамина, 5-метокситриптамина и хипазина) в концентрациях 1 мМ, не был характерен для серотонина. Ни одно из приведенных в табл. 1 соединений не индуцировало, подобно серотонину, рост нейритов у клеток РС12.

Незначительный (не более 20% величины N_1 , индуцированной серотонином) рост нейритов наблюдался при инкубации клеток с триптамином и 5-метокситриптамином. Применение серотонина в креатининовой и адипатной формах не влияло на характер индукции роста нейритов и снижения пролиферативной активности. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что нейритстимулирующий эффект специфичен для серотонина.

Таблица

Влияние агонистов серотонина и индолсодержащих соединений на включение [3H]тимидина клетками РС12

Вещество	Концентрация, мМ	Включение [3H] тимидина по отношению к контрольной культуре (100%), в %
Триптамин	1	цитотоксичен
	0,1	44,2 \pm 2,4
	0,01	89,7 \pm 2,9
5- метокситриптамин	1	цитотоксичен
	0,1	21,2 \pm 0,8
	0,01	78,3 \pm 0,6
Хипазин	1	цитотоксичен
	0,1	77,1 \pm 2,1
	0,01	76,9 \pm 1,6
Триптофан	1	55,0 \pm 3,5
	0,1	92,9 \pm 1,4
	1	49,7 \pm 1,9
5-окситриптофан	0,1	93,2 \pm 0,9
	1	51,2 \pm 0,4
	0,1	90,7 \pm 1,3

Механизм индукции дифференцировки клеток РС12 серотонином, вероятно, отличен от механизма действия ФРН, что следует из различных временных характеристик индукции роста нейритов и влияния на пролиферативную активность, а также из синергизма (или аддитивности) их действия. Ранее было показано, что аналогичные эффекты могут быть вызваны повышенным внутриклеточного уровня сАМР [7, 8]. Нам, однако, не удалось обнаружить увеличения содержания сАМР в клетках РС12, обработанных серотонином. Кроме того, индукция роста нейритов по сАМР-зависимому механизму кратковременна и к 5-м суткам число клеток с нейритами приближается к величине в контрольных культурах, что вызвано компенсирующим действием ФДЭ сАМР [7]. В случае серотонина величина N_1 с первых по пятые сутки растет. Это указывает на способность серотонина стимулировать дифференцировку клеток РС12 по пути, не связанному с повышенным внутриклеточного уровня сАМР. Полученные данные подтверждают существование нескольких различных биохимических путей, по которым может проходить дифференцировка клеток нейронального происхождения.

EFFECT OF SEROTONIN ON DIFFERENTIATION OF PHEOCHROMOCYTOMA PC 12 CELL LINE

POSYPANOVA G. A., *GOLUBEVA E. E., **KONDRATYEV A. D.,
SUVOROV N. N., *SEVERIN E. S.

Moscow Institute of Fine Chemical Technology.

*Institute of Applied Molecular Biology, USSR Ministry of Health, Moscow

**Institute of Molecular Biology, the USSR Acad. Sci, Moscow

The effect of serotonin and its agonists on morphological differentiation and proliferative activity of pheochromocytoma PC12 cells was studied. It was shown that serotonin was able to induce neurite outgrowth and decrease in [³N]-thymidine incorporation into DNA of PC12 cells. Time and concentration dependences of these processes were studied. Nerve growth factor was able to amplify the effect of serotonin. There were shown different mechanisms of PC12 differentiation induction by serotonin, nerve growth factor and compounds that elevated cAMP level.

ЛИТЕРАТУРА

1. Greene L., Tischler A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci., v. 73, p. 2424—2428, 1976.
2. Хэм А., Кормак Д.—В кн.: Гистология, т. 5, с. 106—108, М., Мир, 1983.
3. Rieger F., Shelanski M., Greene L. Develop. Biol., v. 76, p. 238—243, 1980.
4. Dichter M., Tischler A., Greene L. Nature, v. 268, p. 501—504, 1977.
5. Alema S., Casalbore P., Agostini E., Tato F. Nature, v. 316, p. 557—559, 1985.
6. Hagag N., Halegoua S., Vtola M. Nature, v. 319, p. 680—682, 1986.
7. Kondratyev A., Movsesyan V., Severin E. J. Neurochem., v. 44, suppl., S139C, 1985.
8. Guroff G., Dickens G., End D., Londos C. J. Neurochem., v. 37, p. 1431—1439, 1981.
9. Yoffe J., Borchardt R. Mol. Pharmacol., v. 21, p. 368—373, 1982.
10. Кондратьев А. Д., Мовсисян В. А., Северин Е. С., Магалян Ю. А., Дудкин С. М.—В сб.: Материалы девятой всесоюзной конференции по биохимии нервной системы, с. 201—202, Ереван, 1983.
11. Rubin H. Science, v. 167, p. 1271—1272, 1970.
12. Кондратьев А. Д., Алахов В. Ю., Мовсисян В. А., Черный А. А., Кашмир Л. Б., Северин Е. С. Биоорг. химия, т. 12, с. 736—740, 1986.
13. Bradford M. Anal. Biochem., v. 72, p. 248—254, 1976.
14. Мовсисян В. А., Кондратьев А. Д., Дудкин С. М.—В сб.: Проблемы современной биохимии и биотехнологии. Тезисы докладов 8-го объединенного симпозиума биохимических обществ СССР—ГДР, Рига, с. 114—115, 1985.

Поступила 23. V 1988.

КИСЛОЙ КОМПАРТМЕНТ И ЛАТЕНТНАЯ СИСТЕМА
АЦИДИФИКАЦИИ В СИНАПСОСОМАХ МОЗГА

МЕЛЬНИК В. И., ТИТОВ С. Ю., ГЛЕБОВ Р. Н.

НИИ общей патологии и патологической физиологии АМН СССР, Москва

Изучали компартиментацию H^+ в синапсосомах мозга крыс, регистрируя изменения флуоресценции проникающего слабого основания акридиноранжа (АО) в различных средах при pH 7,4. Тушение флуоресценции АО, которое наблюдалось при добавлении синапсом и полностью обращалось протонофером или слабыми основаниями, указывает на присутствие компартамента с низким значением pH (кислого компартамента). Градиент pH, выявляемый АО, сравнительно быстро снижался при хранении синапсом на льду в солевой среде, но в сахарозной среде был достаточно устойчив. В синапсосомах, пермеабилizованных дигитонином или гипосмотическим шок, выявлялась латентная активность АТР-зависимого H^+ -насоса, обеспечивавшая дополнительную ацидификацию. Последняя требовала присутствия хлорида и блокировалась N-этилмаленимидом. Анализ действия дигитонина показывает, что градиенты pH как в отсутствие, так и в присутствии АТР не связаны с плазмалеммой. Следовательно, кислый компартимент ограничен внутритерминальными мембранами и, вероятно, идентичен синаптическим пузырькам, в которых ранее обнаружен H^+ -насос подобного типа. Измерения латентности митохондриального H^+ -насоса показали, что у 15—25% синапсом плазмалемма повреждена (незамкнута). Не обнаружено изменений кислого компартамента при деполаризации синапсом повышением концентрации калия в среде.

Процессы метаболизма и высвобождения медиаторов в нервных окончаниях тесно связаны с поддержанием неравновесного распределения и компартиментацией ионов. Сравнительно хорошо изучены роль и механизмы поддержания градиентов Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , гораздо меньше — компартиментация ионов водорода, хотя в настоящее время не может быть сомнений, что она играет важную функциональную роль. Важным элементом компартиментации H^+ служат синаптические пузырьки (СП), являющиеся местом депонирования медиаторов в нервных окончаниях. Известно, что СП характеризуются повышенной концентрацией H^+ (pH внутри около 5) [1, 2]. Функциональное значение кислой среды в СП проявляется в том, что, во-первых, активность ферментов синтеза медиаторов и процессинга нейропептидов проявляется только в слабокислой среде [3], а во-вторых, поступление медиаторов и их предшественников в пузырьки энергетически сопряжено с электрохимическим градиентом.

H^+ на мембране [4, 5]. В свою очередь, трансмембранный градиент pH в СП поддерживается за счет активного транспорта H^+ -натосом, потребляющим энергию гидролиза АТФ [6, 7].

Все эти факты были установлены в опытах с изолированными везикулами [1—7] или с препаратами мембран СП [8]. Конечно, использование изолированных препаратов является обязательным этапом изучения сложной системы—нервного окончания. Но при этом есть вероятность модификации или потери некоторых регуляторных механизмов в процессе выделения, а это вызывает необходимость либо в последующей реконструкции, либо в нахождении условий, максимально приближенных к ситуации *in situ*. Последнее более реально, так как требуемые условия воспроизводятся в удобной для исследования модели—синапсосомах или изолированных нервных окончаниях. Более того, только на синапсосомах можно изучать влияние на градиенты pH таких процессов, как деполяризация и высвобождение медиаторов.

Целью настоящей работы было изучение градиентов pH , связанных с кислотами внутри компартментами, а также их локализации и механизмов поддержания в синапсосомах мозга крыс. Применяемые методы не позволяют морфологически точно идентифицировать эти компартменты. Поэтому мы будем употреблять термин «кислый компартмент» в широком смысле, хотя, вне сомнения, он представлен в основном синаптическими пузырьками. Исследование АТФ-зависимой ацидификации, которая полностью выявляется только после пермеабиллизации синапсосом, показывает, что значительная часть синапсосом имеет поврежденную (незамкнутую) плазмалемму. Предложен метод количественной оценки содержания поврежденных синапсосом. Исследовали также поведение кислого компартмента при деполяризации синапсосом.

Материалы и методы

Синапсосомы выделяли из коры головного мозга крыс, применяя неравновесное центрифугирование в градиенте плотности сахарозы по методу Najos [9]. Конечный осадок синапсосом суспендировали обычно в сахарозной среде, либо в растворе Кребса-Рингера (составы см. ниже) до концентрации 2—4 мг белка/мл (определяли методом Лоури) и держали на льду в течение опыта.

Градиенты pH измеряли с помощью флуоресцентного зонда АО, применяя метод, ранее описанный для изолированных синаптических пузырьков [7, 8]. Измерения проводили в термостатированных при 25° кюветках, содержащих 2 мкМ АО в соответствующей среде, в конечном объеме 2 мл. В качестве среды измерения использовали либо лишенный бикарбоната раствор Кребса-Рингера (состав в мМ: NaCl—132, KCl—5, NaH_2PO_4 —5, $MgCl_2$ —1,3, $CaCl_2$ —1,2, глюкоза—10, HEPES—20), либо сахарозную среду (сахароза—300, HEPES—20), либо KCl-среду (KCl—150, HEPES—20), всюду pH 7,4 при 25°. Синапсосомы обычно добавляли до концентрации 0,1 мг белка/мл, остальные добавки и измерения—как указано в тексте и в подписях к рисункам.

Деполаризацию синапсом в растворе Кребса-Рингера вызывали добавлением 20 мкл 3 М KCl.

Влияние АТР изучали в KCl-среде, добавляя 50 мкл 40 мМ Mg-АТР (конечная концентрация 1,0 мМ). Измеряли начальную скорость и стационарный уровень АТР-индуцированного транспорта H^+ [7, 8].

Флуоресценцию АО регистрировали в непрерывном режиме на спектрофлуориметре «Hitachi MPF-4» (Япония), длины волн возбуждения и испускания 491 и 530 нм соответственно.

Использовали карбонилцианид *m*-хлорфенилгидразон (Cl-CCP), N-этилмаленимид (NEM), дигитонин, сахарозу и глюкозу («Serva», ФРГ). Cl-CCP растворяли в этаноле, конечная концентрация которого в пробах не превышала 0,5%. Растворы дигитонина готовили свежими в день опыта. Mg-АТР получали смешением эквимоллярных количеств $MgSO_4$ и трис-соли АТР (рН 7,4), которую получали ИОХ Na_2 -АТР («Kеapal», Венгрия). Неорганические соли—отечественного производства, квалификации «хч».

Результаты исследования

Для изучения градиентов рН в синапсоммах, как и в предыдущих работах с изолированными СП мозга [7, 8], применили широко используемый флуоресцентный зонд АО. Незаряженная форма этого амина хорошо проникает через липидные мембраны, благодаря чему он накапливается в кислых компартментах пропорционально градиенту концентрации H^+ , так как протонированная форма (заряженная) через мембраны не проникает. Накопление АО в кислых компартментах сопровождается тушением его флуоресценции, которое в определенных условиях количественно связано с величиной градиента концентраций H^+ [10—12].

Добавление синапсом к среде, содержащей АО, вызывало тушение флуоресценции зонда (рис. 1). Тушение полностью обращалось при добавлении протонофора Cl-CCP, создающего проницаемость для H^+ , или слабых оснований. В качестве последних применяли метиламин либо соли аммония, диссоциирующие до аммиака в водных растворах. Действие слабых оснований обусловлено тем же механизмом, который лежит в основе действия АО (проникновение через мембраны в незаряженной форме и накопление в кислых компартментах), только их концентрации таковы, что протонирование незаряженной формы приводит к устранению самого градиента рН. АО также способен устранять градиенты рН при повышении концентрации выше 5 мкМ (не показано).

Как и следовало ожидать, слабые основания устраняли изменения флуоресценции АО быстро, тогда как действие Cl-CCP замедлялось, вероятно, образованием диффузионного мембранного потенциала этим электрогенным ионофором. Протонофор или слабые основания, если они присутствовали перед добавлением синапсом, предупреждали изменения флуоресценции АО. Эти наблюдения (рис. 1) показывают, что изменения флуоресценции АО в суспензии синапсом обусловлены присут-

ствием градиента рН, связанного с кислым компартментом. Ввиду того, что и зонд, и агенты, устраняющие ΔpH , проникают через мембраны, вопрос о локализации градиентов рН (на плазмалемме или на внутритерминальных мембранах) будет рассмотрен ниже.

Как известно, генерация ΔpH возможна только при условии обеспечения электронейтральности либо за счет сопряженного транспорта анионов, например, Cl^- , либо противотранспорта катионов (см. [12]). Однако тушение флуоресценции АО наблюдалось независимо от того, добавляя ли синапсомы в раствор Кребса-Рингера или в сахарозную среду, лишенную неорганических ионов (рис. 1). Это свидетельствует о том, что наблюдаемый ΔpH является эндогенным, а не индуцируется при добавлении синапсом в среду измерения.

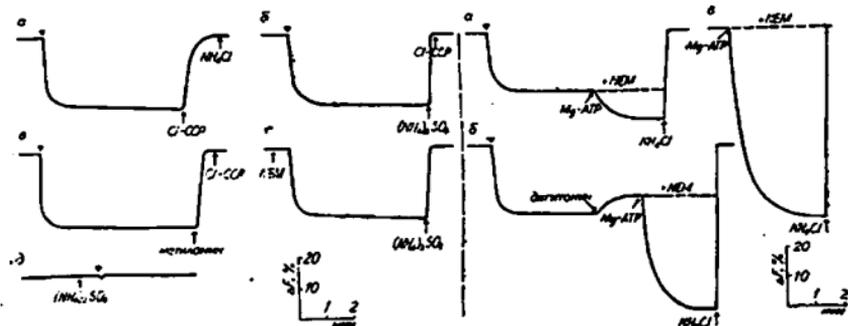


Рис. 1. Изменения флуоресценции акридиноранжа в суспензиях синапсомом. а, б—д— в растворе Кребса-Рингера, б—в сахарозной среде. Момент добавления синапсомом (120 мкг белка/мл) обозначен треугольником, других добавок — стрелками (10 мкМ Cl^-CCP , 10 мМ NH_4Cl , 10 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 0,2 мМ метиламин, 0,3 мМ NEM).

Рис. 2. Влияние Mg-АТР на флуоресценцию акридиноранжа (АО) в суспензии контрольных (а) и пермеабилizованных дигитонином (б) или гипосмотическим шоком (в) синапсомом. Обозначения те же, что и на рис. 1. Добавляли 30 мкМ дигитонин, 1 мМ Mg-АТР, 0,3 мМ NEM в KCl-среде. Небольшое повышение флуоресценции АО, вызванное неспецифическим взаимодействием с АТР [7, 8], вычтено при представлении данных

Такой вывод подтверждается также тем, что непроникающий ингибитор АТР-зависимых H^+ -насосов в различных кислых компартментах клетки — NEM не влиял на эндогенный ΔpH (рис. 1). Не оказывал влияния и блокатор H^+ -насоса митохондрий — олигомицин. Отметим, что присутствие митохондрий (как свободных, так и находящихся внутри синапсомом) не может повлиять на флуоресценцию АО, изменения которой специфичны в отношении кислых компартментов, поскольку в митохондриях ΔpH имеет противоположную направленность.

Степень тушения флуоресценции АО нелинейно связана с параметрами, определяющими кислый компартмент. В качестве количественной характеристики (размера) последнего удобно использовать отношение

потушенной флуоресценции зонда к непотушенной, так как оно пропорционально произведению концентрации H^+ на объем компартмента согласно известной формуле [10, 11]:

$$(F_0 - F)/F = [H^+]_{in} \times V_{in} / [H^+]_{ex} \times V_{ex},$$

где F_0 и F — исходный и конечный уровни флуоресценции, V — объемы кислого компартмента (in) и окружающей среды (ex) соответственно. Определяемая таким образом величина будет безразмерной, и применять ее можно только при сопоставимых условиях измерения.

Наблюдаемый экспериментально размер кислого компартмента должен линейно зависеть от концентрации белка синапсом. Как и в случае изолированных СП [12], линейная зависимость наблюдалась в сравнительно узком диапазоне концентраций, примерно до 0,10—0,15 мг белка/мл. Средняя удельная величина $(F_0 - F)/F$ для синапсом, суспендированных после выделения в растворе Кребса-Рингера, составила в 6 опытах $1,75 \pm 0,19 \text{ мг}^{-1}$, что соответствует тушению флуоресценции на 14,9% при концентрации белка 0,1 мг/мл. Когда синапсомы после выделения суспендировали в сахарозной среде, эта величина составила $2,56 \pm 0,28 \text{ мг}^{-1}$, что при 0,1 мг/белка/мл соответствует тушению флуоресценции на 20,4%. Эти отличия, очевидно, связаны с различной сохранностью кислого компартмента, так как при хранении на льду в растворе Кребса-Рингера способность синапсом аккумулировать АО заметно убывала и через 2—4 часа после выделения невозможно было достичь удовлетворительного уровня флуоресцентных ответов даже при высоких концентрациях белка. Напротив, в сахарозной среде кислый компартмент был достаточно стабильным в течение 6—8 ч.

Для выяснения локализации кислого компартмента и механизмов поддержания ΔpH изучали влияние энергетического субстрата активного транспорта ионов — Mg -АТР на флуоресцентные ответы АО в интактных и пермеабилзованных синапсом. Пермеабиллизацию проводили либо обработкой дигитонином, который, взаимодействуя с холестерином, специфически разрушает плазмалемму, либо путем гипосмотического шока синапсом. В интактных синапсом добавление Mg -АТР мало влияло на флуоресценцию АО, тогда как в синапсом, пермеабилзованных любым из указанных способов, наблюдали резкое тушение флуоресценции, свидетельствующее о сильной дополнительной ацидификации (рис. 2). К такому же результату приводило замораживание и оттаивание синапсом. Таким образом, активность системы АТР-зависимого транспорта H^+ является латентной, а для ее выявления необходимо обеспечить доступ субстрата путем разрушения плазмалеммы синапсом.

Из рис. 2 видно, что наряду с активацией АТР-зависимой ацидификации дигитонин частично устраняет эндогенный ΔpH . Эти явления, однако, пространственно разделены, о чем свидетельствуют резкие отличия концентрационных зависимостей (рис. 3). Активация АТР-зависимого транспорта H^+ имеет 2-фазный характер, она резко убывает при повышении концентрации дигитонина выше 40—50 мкМ. Ясно, что только первая фаза концентрационной зависимости связана со специфи-

ческим действием дигитонина на плазматическую мембрану. Вторая же фаза объясняется неспецифичным детергентным действием при высоких концентрациях дигитонина, когда повреждаются также и те мембраны, где, очевидно, локализована система ацидификации. Показательно, что снижение активации АТР-зависимого транспорта H^+ происходит в том же диапазоне концентраций, в котором наблюдается резкое усиление вызванной дигитонином диссипации эндогенного ΔpH (рис. 3). Это свидетельствует, что компартменты, соответствующие градиентам pH , наблюдающимся и в отсутствие, и в присутствии АТР, идентичны, и в обоих случаях связаны только с внутритерминальными мембранами, но не с плазмалеммой синапсом.

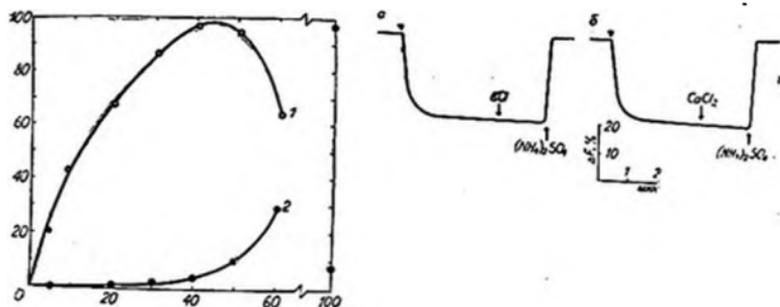


Рис. 3. Концентрационные зависимости влияния дигитонина на эндогенный и АТР-зависимый градиенты pH . 1—АТР-зависимая ацидификация, 2—скорость диссипации эндогенного ΔpH . Измерения проводили в KCl -среде. По оси абсцисс—концентрация дигитонина в μM , по оси ординат—изменение ΔpH в % от макс.

Рис. 4. Градиент pH на мембранах кислого компартмента при деполаризации: синапсом. а—добавлено 40 mM KCl в стандартный раствор Кребса-Рингера, б—добавлено 1,5 mM $CaCl_2$ в безкальциевый раствор Кребса-Рингера с повышенной концентрацией KCl (50 mM). Обозначения те же, что и на рис. 1

АТР-зависимая ацидификация, хотя и в значительно меньшей степени, наблюдается также в синапсомах, не подвергавшихся пермеабиллизации (рис. 2). Она проявляет те же свойства, что и в пермеаблизированных синапсомах: полностью зависит от присутствия Cl^- (максимальная активность в KCl -среде, нет активности в сахарозной среде) и подавляется низкими концентрациями НЕМ (рис. 2). Такие же свойства присущи H^+ -наосу синаптических пузырьков мозга [8, 12]. Как известно, часть синапсом имеет незамкнутую, проницаемую для макромолекул плазмалемму, не проявляя при этом признаков повреждения внутритерминальных мембран [13]. Очевидно, присутствие такой популяции поврежденных синапсом и объясняет происхождение активности, которая наблюдается без пермеабиллизации, но проявляет свойства, идентичные свойствам латентной активности.

Так как дигитонин даже в оптимальных концентрациях вызывает частичное повреждение мембран кислого компартмента (рис. 3), то для измерения степени латентности предпочтение следует отдать гипосмотическому шоку. Хорошо воспроизводимые результаты давала следующая процедура: к 0,10—0,15 мл синапсом добавляли 1,20—1,25 мл бидистиллированной воды и через 1 мин восстанавливали изотоничность прибавлением 0,6 мл 0,5 М КСl в 66,6 мМ НЕРЕС/трис рН 7,4, затем еще через 1 мин добавляли Mg-АТР (1 мМ). Контрольные синапсосомы добавляли в среду после восстановления изотоничности и затем добавляли Mg-АТР. Для выражения АТР-зависимой ацидификации можно применять два параметра—скорость транспорта и общую (стационарную) аккумуляцию H^+ [8]. Однако прямое сравнение активностей будет осложниться тем, что в контрольных синапсосомах имеется значительный эндогенный ΔpH , который после гипосмотической обработки быстро диссипирует (рис. 2). Поэтому необходима соответствующая поправка, ввести которую легко в отношении общей аккумуляции H^+ путем вычитания аккумуляции, наблюдаемой в отсутствие АТР, то есть, эндогенного градиента рН, представленного в форме $(F_0 - F)/F$.

Содержание поврежденных синапсосом, рассчитанное как величина, обратная латентности, то есть как соотношение АТР-зависимой аккумуляции H^+ в контрольных и пермеабелизованных синапсосомах, колебалась между 15—25% в различных препаратах. Эта величина сравнима с оценками присутствия незамкнутых синапсосом от 15 до 32%, основанными на проникновении коллоидных частиц или молекул пероксидазы внутрь синапсосом [13] и на латентности АТР-зависимой аккумуляции Ca^{2+} [14]. Латентность АТР-зависимой аккумуляции H^+ заметно снижалась при хранении синапсосом на льду в растворе Кребса-Рингера, в отличие от сахарозной среды, подобно тому, что отмечено выше в отношении диссипации эндогенного ΔpH . Несомненно, это свидетельствует о нарастающем процессе повреждения синапсосом в ионной среде, которое предупреждается сахарозой.

Большая часть кислого компартмента, вероятно, представлена синаптическими пузырьками (см. «Обсуждение»). Это дает уникальную возможность с помощью АО изучать состояние внутривезикулярной среды при высвобождении медиаторов, сопровождающемся процессами экзо- и эндоцитоза. Когда синапсосомы после предварительного уравнивания в Ca^{2+} -содержащем растворе Кребса-Рингера деполаризовали путем резкого повышения концентрации КСl до 30—50 мМ, уровень флуоресценции АО не изменялся (рис. 4). В другой постановке опытов синапсосомы помещали в бескальциевую среду с повышенной концентрацией калия (50 мМ) и инициировали высвобождение медиаторов добавлением $CaCl_2$ до 1,5 мМ. И в этом случае флуоресценция АО оставалась неизменной, что свидетельствует о стабильности внутривезикулярного рН.

С другой стороны, нельзя исключить, что выброс H^+ вместе с медиаторами все-таки происходит, но быстро компенсируется H^+ -насосом при прекращении контакта синаптических пузырьков с плазмалеммой. Поэ-

тому проверили также возможность изменения рН среды инкубации при деполаризующем воздействии. В этих опытах использовали слабо забуференную среду (1—2 мМ НЕРЕС рН 7,4) с высокой концентрацией синаптосом, а рН среды измеряли либо рН-чувствительным электродом, либо с помощью рН-индикатора бромтимолового синего. В последнем случае регистрировали поглощение 10 мкМ красителя в разном режиме на волновой паре 618 и 648 нм на спектрофотометре «Hitachi 557» (Япония). Изменения рН среды при деполаризации синаптосом повышением концентрации калия до 30—50 мМ не были обнаружены (данные не приводятся).

Обсуждение результатов

Используя флуоресцентный зонд АО, чувствительный к присутствию компартментов с повышенной концентрацией H^+ , мы подтвердили существование такого компартмента в синаптосомах мозга. Очевидно, ни плазмалемма, ни цитоплазма не являются барьером для проникновения АО—легко диссоциирующего, проникающего слабого основания [10] к этому внутритерминальному компартменту. Как показывают опыты по пермеабиллизации синаптосом, в частности, анализ концентрационной зависимости действия дигитонина (рис. 3), в использовавшихся нами условиях (рН 7,4) кислый компартмент является единственным источником флуоресцентных ответов АО.

Отсутствие вклада цитоплазматического компартмента означает, что градиент рН на плазмалемме отсутствует, либо он слишком мал и не обнаруживается при флуоресценции АО. В некоторых работах [15, 16] принимали, что в условиях, сходных с нашими, на плазмалемме синаптосом имеется градиент рН порядка 0,2—0,4 единиц, однако доказательства нельзя считать убедительными. Например, аккумуляция метиламина, на основании которой пытались рассчитывать рН цитоплазмы [15], на самом деле отражает существование кислого компартмента, о чем свидетельствует, помимо прочего, и антагонизм между АО и метиламином, наблюдавшийся в настоящей работе. В другой работе [16] использовали индикатор, искусственно введенный в синаптосомы, однако калибровку проводили в условиях, отличных от цитоплазматических, в частности, в отсутствие Mg^{2+} , который влияет на показания индикатора [16]. Трудности калибровки в подобных случаях обычно приводят к заниженным оценкам рН цитоплазмы [17].

Каков состав кислого компартмента синаптосом? Из всех известных органелл, составляющих кислый компартмент клетки (лизосомы, аппарат Гольджи, эндосомы, окаймленные везикулы, секреторные гранулы), в синаптосомах только два последних присутствуют в заметных количествах, причем преобладают СП (разновидность секреторных гранул), а окаймленные везикулы встречаются редко [13]. Характеристики АТФ-зависимой ацидификации (ингибируемость низкими концентрациями NEM, абсолютная зависимость от наличия хлорида) в синаптосомах совпадают со свойствами H^+ -насосов СП [6—8] и окаймленных везикул

[18]. Следовательно, кислый компартмент синапсом вполне кажедно можно идентифицировать с СП и отчасти с окаймленными везикулами.

АТР-зависимую ацидификацию уже наблюдали в препаратах синапсом ранее, при сравнении различных органелл, используя зонд, родственнй АО [19]. Однако авторы не установили ни происхождение этой активности, ни ее локализацию, оставляя впечатление, будто H^+ -насос локализован на плазмалемме и подкисляет цитоплазму, либо же Mg -АТР прекрасно проникает внутрь синапсом. На самом деле, как показывают наши опыты по пермеабилзации, АТР-зависимая ацидификация приурочена к внутритерминальным мембранам, отграничивающим кислый компартмент, и соответствует в основном H^+ -наосу СП. Часть активности и в наших опытах не была латентной, что объясняется присутствием популяции незамкнутых синапсом с поврежденной плазмалеммой.

Количественная оценка этой популяции на основе латентности АТР-зависимой ацидификации имеет несомненные преимущества по сравнению с другими методами. Она не требует длительной обработки, как в методе, основанном на проникновении коллоидных частиц [13], и гораздо менее подвержена ошибкам, присущим измерениям латентности АТР-зависимой аккумуляции Ca^{2+} , связанным с наличием нескольких компартментов [14]. В то же время предложенный нами метод выгодно отличается от распространенных методов, основанных на латентности лактатдегидрогеназы [20], которая, являясь цитоплазматическим ферментом, будет вымываться из поврежденных синапсом при выделении, что приведет к заниженным оценкам их присутствия.

В то же время в нашем подходе, основанном на измерении активности мембраносвязанного фермента— H^+ -насоса кислого компартмента, также существует вероятность заниженных оценок, если H^+ -насос будет инактивироваться параллельно с повреждением плазмалеммы. Такая возможность, однако, минимальна, поскольку даже в тех условиях, когда латентность АТР-зависимой ацидификации резко снижалась, например, после замораживания/оттаивания, общий уровень АТР-зависимой активности в пермеабилзованных синапсомах оставался практически неизменным. Значительно большую устойчивость внутритерминальных мембран подтверждают и данные о проникновении небольших коллоидных частиц: даже в тех синапсомах, плазмалемма которых была явно поврежденной, признаков повреждения внутритерминальных мембран не наблюдалось [13].

Повреждение плазмалеммы, по-видимому, прямо связано с диссипацией эндогенного ΔpH , наблюдающейся при хранении синапсом, или при замораживании/оттаивании. Оба процесса предупреждались при замене солевого раствора сахарозой, как это наблюдали в отношении другого маркера повреждения плазмалеммы—выхода лактатдегидрогеназы из цитоплазмы синапсом [21]. С другой стороны, эндогенный ΔpH резко снижается во время выделения. Об этом свидетельствует значительное превышение размера кислого компартмента (примерно на порядок) после добавления АТР к пермеабилзованным синапсомам по отношению к

исходному уровню в контрольных синапсосомах (рис. 2). Механизмы повреждения при выделении неясны, но имеют общий характер. Во всяком случае, когда для выделения применяли изотонические градиенты фикола, присутствие поврежденных синапсосом не снижалось, следовательно, пребывание синапсосом в гиперосмотическом растворе сахаразы при выделении их по методу Hajos [9] не вызывает дополнительных повреждений.

Исследуя влияние деполяризации на кислый компартмент синапсосом, мы исходили из того, что при экзоцитозе СП ионы водорода могут освобождаться в среду. Отсутствие изменений кислого компартмента можно объяснить быстрой компенсацией потери протонов H^+ -насосом, учитывая кратковременность контакта СП с плазмалеммой. Однако мы не смогли обнаружить изменения рН среды инкубации, что сблизить труднее, особенно в свете данных об изменении рН при стимуляции срезов мозга, которые выражались в быстром, но небольшом подкислении, сменявшемся в течение примерно 100 мсек защелачиванием, в свою очередь переходившем в более мощное подкисление [23]. Как мы уже указывали выше, после выделения синапсосом концентрация H^+ в кислом компартменте сильно снижена. Вследствие этого чувствительность наших методов могла оказаться недостаточной. Но существует и другое объяснение. Синапсосомы являются пресинаптическими образованиями, тогда как изменения рН, обнаруженные при электрической стимуляции [23], могли быть обусловлены постсинаптическими механизмами. В этом отношении стоит отметить, что подобные трехфазные изменения рН недавно наблюдали при аппликации агонистов возбуждающего медиатора — глутамата [24].

В заключение отметим, что возможность применения АО для исследования кислого компартмента в синапсосомах открывает перспективы для решения различных вопросов, касающихся как физиологической роли кислого компартмента, так и его фармакологической чувствительности, в частности, выявления агентов, обладающих ацидотропным действием, особенно при сравнении их действия на изолированные СП.

AN ACIDIC COMPARTMENT AND A LATENT ACIDIFICATION SYSTEM IN BRAIN SYNAPTOSOMES

MELNIK V. I., TITOV S. Yu., GLEBOV R. N.
Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, USSR
Acad. of Medical Sci., Moscow

Compartmentation of H^+ in rat brain synaptosomes was studied by monitoring fluorescence changes of a permeant weak base, acridine orange (AO), in various media at pH 7, 4. The quenching of AO fluorescence obtained upon addition of synaptosomes and completely reversed by protonophore or weak bases indicates the presence of a compartment with low pH value (acidic compartment). The pH gradient detected with AO diminished fairly rapidly when synaptosomes were stored on ice in a salt medium but was enough stable in a sucrose medium. In 346

synaptosomes permeabilized by digitonin or hypoosmotic treatment, a latent activity of the ATP-dependent H⁺-pump was unmasked which provided additional acidification. The activity mentioned required the presence of chloride and was blocked by N-ethylmaleimide. Analysis of the digitonin action revealed that pH gradients both in the absence and in the presence of ATP were not associated with plasmalemma. Thus the acidic compartment is restricted by intraterminal membranes and may be identical with synaptic vesicles where a similar H⁺-pump had been found earlier. Measurements of the nonmitochondrial H⁺-pump latency suggested that in 15–25% of the synaptosomes plasmalemma was damaged (unsealed). No changes in the acidic compartment were found when synaptosomes were depolarized by the enhancement of potassium concentration in the medium.

ЛИТЕРАТУРА

1. Michaelson D. M., Angel I. *Life sci.*, v. 27, № 1, p. 39–44, 1980.
2. Faldner H. H., Stadler H. *Eur. J. Biochem.*, v. 121, № 3, p. 519–524, 1982.
3. Hook V. Y. H., Loh Y. P. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA Biol. Sci.*, v. 81, № 9, p. 2776–2780, 1984.
4. Toll L., Howard B. D. *Biochemistry*, v. 17, № 13, p. 2517–2523, 1978.
5. Anderson D. C., King S. C., Parsons S. M. *Biochemistry*, v. 21, № 13, p. 3037–3043, 1982.
6. Stadler H., Tsukita S. *EMBO J.*, v. 3, № 13, p. 3333–3337, 1984.
7. Мельник В. И., Глебов Р. Н., Крымжановский Г. Н. *Бюл. exper. биол. и мед.*, т. 99, № 1, с. 35–38, 1985.
8. Мельник В. И., Глебов Р. Н. *Нейрохимия*, т. 6, № 4, с. 517–530, 1987.
9. Hajos F. *Brain Res.*, v. 93, № 3, p. 435–489, 1975.
10. Lee H.-C., Forte J. G. *Biochim. et biophys. acta.*, v. 508, № 2, p. 339–356, 1978.
11. Владимиров Ю. А., Добрецов Г. Е. *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*. М., Наука, 1980.
12. Глебов Р. Н., Мельник В. И., Туттов С. Ю. *Биохимия*, т. 52, № 11, с. 1818–1828, 1987.
13. Fried R. C., Blaustein M. P. *J. Cell Biol.*, v. 78, № 3, p. 685–700, 1978.
14. Blaustein M. P., Ratzlaff R. W., Schweltzer E. S. *J. Gen. Physiol.*, v. 72, № 1, p. 43–66, 1978.
15. Akerman K. E. O., Hetnonen E., Katta K., Scott I. G. *Biochim. et biophys. acta*, v. 858, № 2, p. 275–284, 1986.
16. Richards C. D., Metcalfe J. C., Smith G. A., Hesketh T. R. *Biochim. et biophys. acta*, v. 803, № 3, p. 215–220, 1984.
17. Deutsch C. J., Kashtwagura T., Taylor J., Wilson D. F., Erecitska M. *J. Biol. Chem.*, v. 260, № 11, p. 6808–6810, 1985.
18. Xio X.-S., Stone D. K., Racker E. *J. Biol. Chem.*, v. 258, № 24, p. 14834–14838, 1983.
19. Cidon S., Ben-David H., Nelson N. *J. Biol. Chem.*, v. 258, № 19, p. 11654–11688, 1983.
20. Adam-Vizi V., Marchbanks R. M. *J. Neurochem.*, v. 41, № 3, p. 760–785, 1983.
21. Sperk G., Baldessarini R. J. *J. Neurochem.*, v. 28, № 6, p. 1403–1405, 1977.
22. Booth R. F. G., Clark J. B. *Biochem. J.*, v. 176, № 2, p. 365–370, 1978.
23. Крышгаль О. А., Осипчук Ю. В., Шелест Т. Н. *Бюл. exper. биол. и мед.*, т. 101, № 6, с. 643–645, 1986.
24. Endres W., Ballanyi K., Serve G., Grafe P. *Neurosci. Lett.*, v. 72, № 1, p. 54–58, 1986.



УДК 612.822.3:577.112.38:

ВЛИЯНИЕ NAD И АДЕНОЗИНА НА ЗАХВАТ [¹⁴C] ГАМК СИНАПТОСОМАМИ КОРЫ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ МОЗГА КРЫС

АРУТЮНЯН А. В., ГУЛЯН Э. А., НЕРСИСЯН Ц. М.,
АПРИКЯН Г. В., КОЧАРЯН М. Г.

Институт биохимии АН Арм.ССР, Ереван

Изучено влияние NAD и аденозина на высокоаффинный захват ГАМК синаптическими коры больших полушарий головного мозга крыс. Установлено, что NAD в концентрациях, близких к физиологическим (10^{-6} — 10^{-5} М), ингибирует этот процесс на 60—40%, причем ингибирование носит неконкурентный характер. Аденозин в этих же концентрациях вызывает незначительное повышение уровня захвата ГАМК.

Полученные данные рассматриваются с точки зрения существования различных механизмов, лежащих в основе нейромодуляторной функции NAD и аденозина.

Эксперименты, проведенные с применением различных производных NAD и ингибиторов NAD-гликогидролазы, свидетельствуют о том, что ингибирующий эффект на захват ГАМК обусловлен целой молекулой NAD и не связан с его синаптосомным распадом.

В статье обсуждается вопрос о возможном участии безводисалпиховых рецепторов, одним из лигандов которых является NAD, в реализации его эффекта на процесс высокоаффинного захвата ГАМК синаптическими головным мозга.

Концепция Burnstock [1] о нейромедиаторной и нейромодуляторной роли аденозина и АТР получила развитие на основе фармакологических исследований, выполненных на периферической НС. Постулируется, что действие аденозина осуществляется посредством специфических пуринорецепторов типа P_1 , а АТР— P_2 . При этом P_1 -пуринорецепторы обладают незначительным сродством к АТР, а P_2 -пуринорецепторы—напротив, к аденозину.

Результаты биохимических, электрофизиологических и, в меньшей степени, ауторадиографических исследований свидетельствуют о том, что аденозин и адениннуклеотиды выполняют, главным образом, нейромодуляторную функцию в ЦНС [2].

Недавно появились данные, свидетельствующие о существовании в ЦНС независимой от аденозина и АТР системы рецепции NAD, содержание которого в синаптических значительно превосходит концентрацию аденозина и составляет $4 \cdot 10^{-5}$ М [3]. Обнаружено наличие двух NAD-свя-

зывающих участков на синаптических мембранах коры мозга, отличающихся высоким и низким сродством [4, 5]. Показано также, что связывание NAD осуществляется, главным образом, за счет его аденозинового компонента [6].

Установлено, что как аденозин [7], так и NAD [5, 8] угнетают нейрональную активность. По мнению ряда исследователей, депрессантное действие аденозина связано с подавлением под его влиянием процесса высвобождения возбуждающих нейромедиаторов [2, 7]. Вопросы, связанные с участием NAD в синаптических процессах, мало изучены.

В данном сообщении приведены результаты исследования модуляторного влияния NAD и аденозина на захват ГАМК, обладающего, наряду с глицином и таурином, выраженной тормозной функцией в НС.

Материалы и методы

Исследования проводили на половозрелых крысах-самцах массой 180—200 г. Синапсомы выделяли из коры головного мозга крыс по методу Hajos [9]. Осадок синапсом суспендировали в 0,32 М сахарозе. Состав среды поглощения: 0,1 М Na^+ -фосфатный буфер, pH 7,4—4,24 μM ; 1 М NaCl—4,8 мл; 1 М KCl—0,2 мл; 0,1 М MgCl_2 —1 мл; 0,4 М глюкоза—2 мл и H_2O —27,8 мл. Пробы содержали 0,83 мл среды поглощения, 0,1 мл синапсомной суспензии (200 мкг белка), немеченую ГАМК в концентрации 10^{-5} М, аминоксиуксусную кислоту (АОУК) в той же концентрации для ингибирования трансаминирования и 0,05 мкКв/мл [^{14}C] ГАМК, а также 0,07 мл NAD или других ингредиентов в различных концентрациях. Захват ГАМК синапсомной фракцией определяли после инкубирования проб при постоянном встряхивании и температуре 37° в течение 20 мин. Реакцию останавливали добавлением 1 мл ледяной среды поглощения. Пробы центрифугировали при 4000 об/мин в течение 15 мин при 4°, или фильтровали через мембранные фильтры («Millipore», США; 0,45 мкм). Осадок или фильтры растворяли в 0,5 мл диметилсульфоксида.

Радиоактивность измеряли с использованием сцинтилляционной жидкости Брэя на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-4221» (Франция).

Белок определяли по методу Lowry и соавт. [10]. В опытах использовали следующие реактивы: ГАМК и АОУК («Sigma», США), [^{14}C] ГАМК (11,8 мКи/ммоль, Венгрия), NAD, никотинамид, изониазид («Serva», ФРГ), ADP-рибозу, никотинамидмононуклеотид, аденозин, дезаминдо- и дезаминдо-NAD (Sigma, США).

Результаты исследований

Как видно из данных, представленных в таблице, облегченная диффузия, а также Na^+ -независимый транспорт ГАМК в условиях наших опытов (свежеприготовленные синапсомы) составляют всего 5,2 и 5,9% соответственно от высокоаффинного захвата, являющегося актив-

ным Na^+ -зависимым процессом. Таким образом, накопление $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ в синапсосомах за счет Na^+ -независимых механизмов весьма незначительно и, как показали наши исследования, не подвержено влиянию добавленных NAD или аденозина.

Наряду с этим, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о разнонаправленном действии NAD и аденозина на процесс обратного захвата ГАМК синапсосомами коры больших полушарий мозга крыс.

На рис. 1 показано изменение захвата $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ в зависимости от концентрации NAD и аденозина. В контроле захват ГАМК составляет $53,6 \pm 2,5$ нмоль/мг белка. Обнаружено, что NAD в концентрациях, близких к физиологическим (10^{-6} — 10^{-5} М), подавляет этот процесс на

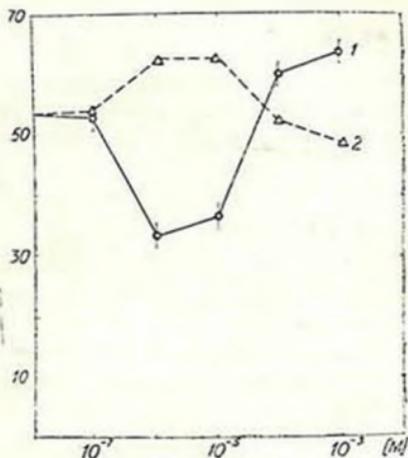


Рис. 1. Влияние NAD (1) и аденозина (2) на захват $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ синапсосомами коры головного мозга крыс. По оси абсцисс — концентрация добавленного NAD или аденозина (М), по оси ординат — захват $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ (нмоль/мг белка · 20 мин)

60—40%. При повышении концентрации NAD вышеуказанного диапазона отмечается незначительное повышение поглощения ГАМК (в концентрации 10^{-3} М NAD усиливает обратный захват ГАМК приблизительно на 23%). Характерно, что эффективные в отношении ГАМК концентрации NAD не влияют на высокоаффинный синапсосомный захват возбуждающих аминокислот—глутамата и аспартата (неопубликованные данные).

Эффект аденозина на захват ГАМК синапсосомами мозга выражен значительно слабее по сравнению с NAD , причем динамика изменений при этом носит противоположный характер. В концентрациях 10^{-6} — 10^{-5} М аденозин вызывает незначительное (около 20%) повышение захвата ГАМК , а в концентрации 10^{-4} — 10^{-3} М не влияет на этот процесс. Неэффективными в отношении захвата ГАМК оказались и низкие концентрации аденозина, так же как и NAD (10^{-7} М).

Полученные результаты не позволяют судить, связано ли действие NAD на захват $[^{14}\text{C}]\text{ГАМК}$ с целостностью молекулы этого динуклеотида или может быть обусловлено его синапсосомным распадом. По

данным Кучмеровской и соавт. [11], в синапсоммах головного мозга крыс NAD расщепляется влиянием NADазы и в очень незначительной степени—NAD-пирофосфорилазы.

Таблица

Поглощение [¹⁴C]ГАМК в синапсомной фракции коры мозга крыс при различных условиях инкубации.

Условия инкубации	Количество [¹⁴ C]ГАМК в синапсомной фракции (нмоль/мг белка·20 мин)
Среда поглощения, 37°	53,6±2,5
Среда поглощения, 37°; вместо 1M NaCl добавлен 1M LiCl	3,2±0,2
Среда поглощения, 0° с 1M NaCl	2,8±0,1

Исходя из этого, в следующей серии экспериментов мы использовали ингибиторы NADазы никотинамид (NAM), никотинамидмононуклеотид (NMN), изониазид (INH). Согласно данным, полученным в нашей лаборатории Мовсесян, активность NADазы во фракции синапсом, используемой нами для изучения влияния NAD на захват аминокислот составляет 26,6 нмоль/мг белка/мин и ингибируется в присутствии NAM, INH (10—20 мМ) и NMN (5·10⁻⁴ М) соответственно на 80, 95 и 98%.

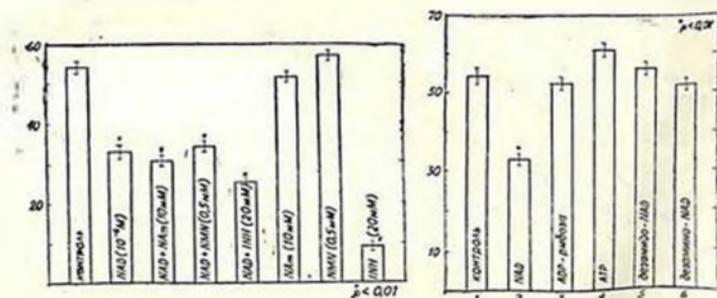


Рис. 2. Влияние ингибиторов NAD—гликогидролазы на захват [¹⁴C]ГАМК (нмоль/мг белка·20 мин) синапсомами головного мозга крыс

Рис. 3. Влияние пуриновых нуклеотидов (10⁻⁶ М) на захват [¹⁴C]ГАМК (нмоль/мг белка·20 мин) синапсомами головного мозга крыс

Из данных, приведенных на рис. 2, видно, что NAM и NMN не оказывают существенного влияния на ингибирование захвата ГАМК под воздействием NAD. Исключение составляет INH, в присутствии которого ингибирующий эффект NAD несколько ослабевает. При этом характерно, что INH в отличие от NAM и NMN сам по себе является мощным ингибитором захвата ГАМК.

Следует отметить, что к числу наиболее распространенных ингибиторов захвата ГАМК относятся никеотовая и аминоникеотовая кислоты, являющиеся насыщенными производными никотиновой кислоты, которая сама этим свойством не обладает [12]. Возможно, аналогичным образом действует на захват ГАМК изониазид, представляющий собой гидразид изоникотиновой кислоты. Полагают, что эффект ингибирования обусловлен приблизительно одинаковой величиной внутримолекулярного расстояния между заряженными центрами в молекуле ГАМК и указанных производных никотиновой кислоты [12].

Полученные данные указывают на то, что наблюдаемый эффект на захват ГАМК вряд ли может быть обусловлен его распадом под влиянием синаптических ферментов, прежде всего NADазы. Кроме того, продукты NADазного расщепления—ADP-рибоза и NAM подобным действием не обладают. Не влияют на этот процесс также АТР и NMN, которые могут образоваться из NAD при действии малоактивной NAD-пиррофосфатазы (рис. 2, 3).

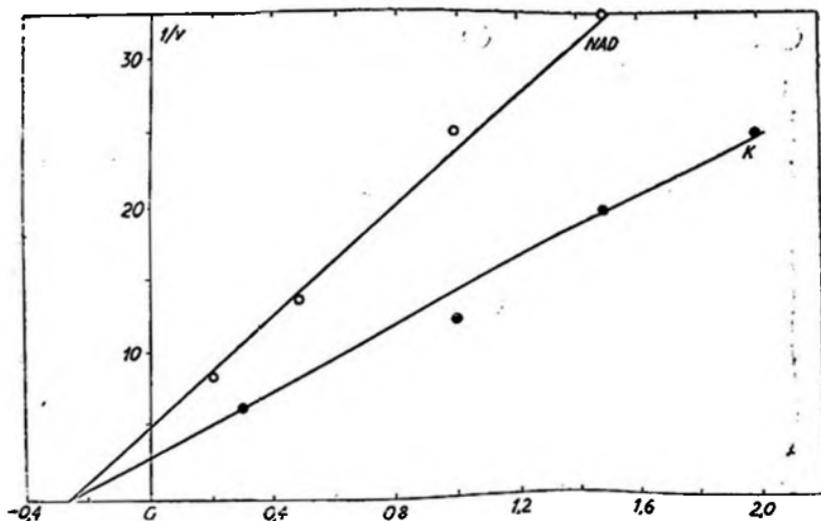


Рис. 4. Кинетика захвата [¹⁴C]ГАМК синаптическими головками мозга крыс по Лайнувару-Берку в отсутствие и присутствии NAD (10⁻⁶ М). По оси абсцисс — величины 1/ГАМК · 10⁻⁷ М, по оси ординат — количество [¹⁴C]ГАМК (нмоль/мг белка · 5 мин)⁻¹

Ранее было обнаружено, что в мозговой ткани NAD подвергается дезамидированию и дезаминированию с образованием соответственно дезамидо- и дезамино-NAD [13]. Добавление этих производных NAD к синаптической фракции мозга, как видно из данных, приведенных на рис. 3, как и в случае ADP-рибозы, NAM, NMN и АТР, не отражается на захвате [¹⁴C] ГАМК синаптическими.

Кинетический анализ захвата [^{14}C] ГАМК в присутствии NAD показал, что вызванное им ингибирование носит неконкурентный характер, о чем свидетельствуют данные о снижении V с 0,33 до 0,19 нмоль/мг белка при неизменной величине K_m , равной $3,57 \cdot 10^{-7}$ М (рис. 4).

Обсуждение результатов

В настоящее время внимание исследователей широко привлекает изучение некоферментных функций NAD. К ним относится, в первую очередь, участие NAD в посттрансляционной модуляции белков путем ADP-рибозилирования и вызванное этим процессом изменение матричной активности хроматина, дифференциации и трансформации клеток.

В нервной ткани важным аспектом изучения некоферментной роли NAD является его участие в модуляции синаптических процессов. Ряд данных указывает на общность механизма действия NAD и аденозина на нейрональную активность. Оба соединения оказывают выраженное депрессантное влияние на биоэлектрическую активность корковых нейронов, которое полностью снимается под влиянием аминоксилана и других блокаторов P_1 -пуринергических нервов [14]. Показано также, что антагонисты аденозина (теофиллин, изоамилбутилксантин и изобутилметилксантин) подавляют процесс специфического связывания NAD синаптическими мембранами [6].

Первоначально полагали, что депрессантное действие аденозина на корковые нейроны связано со стимулированием аденилатциклазной системы и повышением уровня внутриклеточного cAMP. Впоследствии было обнаружено, что в нейрональных мембранах, наряду с A_2 -рецепторами, ответственными за стимулирующий эффект аденозина на аккумуляцию cAMP, представлены A_1 -рецепторы, связывание аденозина с которыми приводит к снижению внутриклеточного содержания cAMP [15, 16]. Однако точная роль и локализация двух типов рецепторов в ЦНС до сих пор не представляется ясной, хотя установлено, что стимулирование A_1 -рецепторов вызывает ингибирование высвобождения «возбуждающих» нейромедиаторов [2].

Нейромедиаторная роль аденозина исследована довольно обстоятельно. Показано, что аденозин ингибирует пресинаптическое высвобождение АХ [17], норадреналина [18], дофамина [19] и аспартата [20].

Халмуратов и соавт. [21] наблюдали стимулирование высвобождения под влиянием NAD в концентрации 10^{-3} М дофамина и серотонина, что не характерно для аденозина, являющегося, как отмечалось, ингибитором пресинаптического высвобождения нейромедиаторов. Результаты этих исследований, так же как и полученные нами данные в отношении захвата ГАМК, выявили дозозависимый характер эффекта ГАМК. В относительно низких концентрациях ($6 \cdot 10^{-6}$ — $5 \cdot 10^{-5}$ М) NAD вызывал выраженное ингибирование высвобождения дофамина. Можно допустить, что при применении высоких концентраций наблюдается его неспецифическое деполаризующее действие на синаптическую мембрану.

В настоящее время наличие на синаптической мембране специфических участков связывания NAD, как было сказано выше, не вызывает сомнений. Можно было бы полагать, что они соответствуют P₂-пурино-рецепторам по классификации Burnstock, которые обладают значительно более высокой чувствительностью к АТР, по сравнению с аденозином, не модулируют повышения уровня сАМР и не блокируются метилксантинами [1]. Однако, как показали наши предыдущие исследования, специфическое связывание [¹⁴С]ГАМК синаптическими мембранами коры мозга заметно подавляется в присутствии метилксантинов [6]. Это указывает на существование специфического рецептора NAD, отличающегося от описанных в литературе пуриновых и аденозиновых рецепторов. Полученные нами результаты о неодинаковом характере действия NAD и аденозина на синапсомный захват ГАМК подтверждают это предположение.

Недавно было обнаружено, что NAD способен взаимодействовать с бензодиазепиновыми рецепторами синаптических мембран, причем с большей эффективностью по сравнению с NAm, являющимся одним из возможных эндогенных лигандов этих рецепторов [22]. Наряду с этим: в последние годы сформировалось представление о сопряженности бензодиазепиновых рецепторов с участками связывания ГАМК на синаптической мембране [12, 23], благодаря чему в противосудорожное действие бензодиазепинов вовлекается ГАМК-ергическая система.

Исходя из этого, нельзя исключить, что наблюдаемый эффект NAD на процесс захвата ГАМК может быть также обусловлен его взаимодействием с бензодиазепиновыми рецепторами. В этой связи интересно отметить, что NAm, используемый нами в эквимоларной концентрации с NAD, не оказывает ингибирующего действия на захват ГАМК, тогда как повышение его концентрации до 100 мМ почти полностью подавляет этот процесс. Этот факт находится в полном соответствии с данными Фоменко и свавт. [22], показавших, что концентрация NAm, способная замещать специфический лиганд бензодиазепиновых рецепторов [³H]флу-нитрозепама, на 3 порядка превосходит необходимую для этого концентрацию NAD.

Полученные нами результаты о функциональной связи между ГАМК-ергической системой и пуриновыми соединениями, к которым относится NAD, находят косвенное подтверждение в ранее опубликованных работах. Показано, в частности, что процесс Na⁺-независимого связывания [³H]ГАМК клеточными мембранами мозга крыс ингибируется различными пуринами [24]. Недавно было также установлено, что специфическое связывание ГАМК с ее рецептором ингибируется в присутствии нейротоксина апамина [25], который, помимо селективного действия на Ca²⁺-зависимые K⁺-каналы, является, по данным некоторых авторов, блокатором пуринергической передачи [26].

Как уже отмечалось, угнетение нейрональной активности под влиянием аденозина и аденинуклеотидов, связывают с подавлением процесса высвобождения возбуждающих нейромедиаторов. Значительный интерес

представляет в этой связи изучение влияния NAD на процесс синаптического высвобождения ГАМК, однако уже описанные в данной статье результаты свидетельствуют о том, что наблюдаемые в ЦНС физиологические эффекты могут быть обусловлены изменением функциональной активности системы ГАМК.

EFFECT OF NAD AND ADENOSINE ON THE UPTAKE OF [¹⁴C] GABA BY RAT BRAIN CORTEX SYNAPTOSOMES

HAROUTUNIAN A. V., GULIAN E. A., NERSSISSIAN Tz. M., APRIKIAN G. V., KOCHARIAN M. G.

Institute of Biochemistry, Acad. Sci. of Arm. SSR, Yerevan

The effect of NAD and adenosine upon the high affinity uptake of GABA by rat brain cortex synaptosomes have been studied. It has been ascertained that in concentrations near to physiological (10^{-6} — 10^{-5} M) NAD inhibited this process by 40—60% and that the inhibition was noncompetitive. Within the same concentration limits adenosine aroused nonsignificant increase in the level of GABA uptake. The data obtained have been considered from the standpoint of the existence of various mechanisms being the basis of NAD and adenosine neuromodulatory function. Experiments in which various derivatives of NAD and inhibitors of NAD-glycohydrolase have been used testified that the inhibitory effect on GABA uptake was caused by native molecule of NAD and was not connected with its synaptosomal breakdown. Taking into consideration that nicotinamide is one of ligands of benzodiazepine receptors, their possible participation in the realization of nicotinamide effect upon the high affinity uptake of GABA by brain synaptosomes have been discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Burnstock G.—In: Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones (ed. R. W. Straub, L. Balis), p. 107—110. Raven Press, N. Y., 1978.
2. Phillips J. W., Wa P. H. Prog. Neurobiol., v. 16, p. 187—239, 1981.
3. Mc Illwain H., Practical Neurochemistry, Acad. Press., London, 1975.
4. Халмуратов А. Г., Пархомец П. К., Кучеровская Т. М., Чичковская Г. В. Биохимия, т. 48, № 8, с. 1287—1292, 1983.
5. Richards C. D., Snell C. R., Snell P. H. Br. J. Pharmacol., v. 79, p. 553—564, 1983.
6. Халмуратов А. Г., Кучеровская Т. М., Пархомец П. К., Клименко А. П., Арутюнян А. В., Мовсесян Н. О. Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 133—138, 1987.
7. Stone T. N. Neuroscience, v. 6, p. 523—555, 1981.
8. Richards C. D., Snell C. R., Snell P. M. J. Physiol. (Gr. Brit.), v. 336, p. 63—64, 1983.
9. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem. v. 193, p. 265—275, 1951.

11. Кучмеровская Т. М., Чичковская Г. В., Пархомцу П. К., Халмуратов А. Г. Докл. АН УССР, серия «Б», № 3, с. 71—74, 1984.
12. Расовский К. С., Гсорлицев В. П. Медиаторные аминокислоты, М., Медицина, 1986.
13. Арутюнян А. В., Мовсисян Н. О., Урганджян М. Г., Бурназян А. Б. Нейрохимия, т. 3, № 1, с. 41—46, 1984.
14. Stone T. W., Perkins M. N. Brain Res., v. 229, p. 241—245, 1981.
15. Hamprecht B., Van Calcer D. Trends Pharmacol. Sci., v. 6, p. 153—154, 1985.
16. Williams M., Braunkwalder A. J. Neurochem., v. 47, p. 88—97, 1986.
17. Vizi E. S., Knoll S. Neuroscience, v. 1, p. 391—398, 1976.
18. Harms H. H., Würde H. G., Muelder A. H. Neuropharmacology, v. 18, p. 577—580, 1979.
19. Michaelis M. L., Michaelis E. K., Myers S. L. Life Sci., v. 24, p. 2093—2092, 1979.
20. Drejer J., Frandson A., Honore T., Schotsbue A. Neurochem. Intern., v. 11, p. 77—81, 1987.
21. Халмуратов А. Г., Кучмеровская Т. М., Пархомцу П. К., Нейрохимия, т. 6, № 4, с. 495—502, 1987.
22. Фоменко А. И., Халмуратов А. Г., Пожарун С. А., Степаненко С. К. Нейрохимия, т. 7, № 1, с. 26—32, 1988.
23. Olsen R. W. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., v. 22, p. 245—277, 1982.
24. Ticks M. K., Burch T. Biochem. Pharmacol., v. 29, p. 1277—1280, 1982.
25. Кузнецов В. И., Тонких А. К., Каранова М. В., Ким О. Н., Такавасо А. А., Садыжов А. С. Нейрохимия, т. 4, № 2, с. 181—184, 1985.
26. Владимирова Н. А., Шуба М. Ф. Нейрофизиология, т. 10, с. 295—299, 1974.

Поступила 7. IV 1988

СОПРЯЖЕНИЕ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛЬНОГО ЦИКЛА
С ТРАНСПОРТОМ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ ЧЕРЕЗ
МЕМБРАНУ СИНАПТОСОМ МОЗГА КРЫССЕЛИЦЕВА А. А., БРУСОВАНИК В. И., КРАВЦОВ Г. М.,
КОЗЛОВ Ю. П., ШРАГИН А. С.

Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова

Исследовали влияние активации фосфатидилинозитольного цикла на потенциалзависимое поступление Ca^{2+} в синапсомы головного мозга крыс. При инкубации синапсом с фосфолипазой С из *Bacillus cereus*, специфичной к фосфатидилинозитам, обнаружено увеличение поступления Ca^{2+} в синапсомы в среде, сохраняющей их трансмембранный потенциал. В среде, деполаризующей синаптические мембраны, влияние этой фосфолипазы на поступление Ca^{2+} не установлено. Фосфатидная кислота и фосфолипаза Д в низких концентрациях действовали аналогичным образом. Блокатор потенциалзависимых кальциевых каналов верапамил уменьшает активирующие эффекты фосфолипазы. Неспецифичные фосфолипазы С и A_2 не оказывали влияния на поступление Ca^{2+} в синапсомы, как и активатор протеникиназы С β -форболовый эфир, а также некоторые жирные кислоты. Напротив, арахидоновая кислота увеличивала накопление Ca^{2+} в среде, сохраняющей трансмембранный потенциал синапсомы. Полученные данные свидетельствуют о возможности регуляции проницаемости синаптических мембран для Ca^{2+} продуктами метаболизма фосфатидилинозитов.

Взаимодействие некоторых агонистов с рецепторами клеточных мембран сопровождается увеличением скорости поступления Ca^{2+} через плазматические мембраны и активацией метаболизма минорных компонентов мембран—фосфатидилинозитов (ФИ). В этой связи было выдвинуто предположение о существовании сопряжения между этими процессами [1]. На первой стадии превращения ФИ и полифосфоинозитид (ПФИ) гидролизуются специфичной фосфолипазой С до 1,2-диацилглицерола (ДАГ), который остается в мембране, и инозитолфосфатов, растворимых в воде, на второй стадии реакции образуется фосфатидная кислота (ФК). Инозитолфосфаты и ФК регулируют уровень внутриклеточного кальция различными способами: ФК является ионофором кальция, а инозитолфосфаты вызывают выход кальция из эндоплазматического ретикулума в цитозоль. ДАГ активирует протеникиназу С, которая способна изменить (увеличивать или понижать) уровень внутриклеточного кальция [2]. Наряду с этим ДАГ может активировать фосфолипазу A_2 [3].

В последние годы резко возрос интерес к изучению метаболизма ФИ и ПФИ в нейрональной ткани. Показано, что ускорение распада и ресинтеза ФИ и ПФИ в нейрональной ткани может быть вызвано рядом факторов: медиаторами [4], деполяризацией мембран высокими концентрациями K^+ [5], обработкой синапсом электрическим током [6]. Однако оказалось, что существуют медиаторы, способные ускорять метаболизм ФИ, не оказывая какого-либо действия на базальное поступление ионов кальция в синапсомы [7]. Вопрос об участии метаболитов ФИ в регуляции поступления Ca^{2+} по потенциалзависимым каналам практически не исследован. В связи с этим задачей настоящей работы явилось установление принципиальной возможности участия гидрофобных метаболитов ФИ (ДАГ и ФК) в регуляции транспорта Ca^{2+} через плазматическую мембрану изолированных нервных окончаний. Для этого исследовалось влияние специфичной к ФИ фосфолипазы С на поступление Ca^{2+} в синапсомы и ее действие сопоставлялось с действием фосфолипазы С, не обладающей такой специфичностью. Также было оценено влияние на транспорт Ca^{2+} арахидоновой кислоты, образование которой сопряжено с активацией ФИ-цикла.

Материалы и методы

В экспериментах использовали крыс-самцов линии *Wistar* массой 150—180 г. После декапитации животных готовили 10%-ный гомогенат коры мозга в среде, содержащей 0,32 М сахарозу, 1 мМ ЭДТА, 50 мМ трис, рН 7,4 в гомогенизаторе стекло-тефлон («В. Вагн», ФРГ). Гомогенат центрифугировали при 1300 g 5 мин, затем полученный супернатант осаждали при 18000 g 20 мин. Осадок грубой митохондриальной фракции наносили на ступенчатый сахарозный градиент и синапсомы далее выделяли по методу Hajos [8]. Выделенные синапсомы ресуспендировали в растворе сахарозы (0,32 М) и содержали при 0°. Все вышеописанные процедуры проводились с охлажденными растворами при температуре не выше 2°. Оценка сохранности синапсом и чистоты их выделения производили с помощью электронной микроскопии, а также определения уровня активности лактатдегидрогеназы [9] по фракции интактных синапсом в отсутствие и в присутствии 1%-ного тритона X-100. Белок определяли по методу Bradford [10]. Транспорт Ca^{2+} внутрь синапсом исследовали методом изотопной метки с помощью мембранной фильтрации. Вход [^{45}Ca] в синапсомы регистрировали в среде, сохраняющей трансмембранный потенциал (так называемой среде покоя) (145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1,3 мМ $MgCl_2$, 20 мМ HEPES, 5 мМ $NaHCO_3$, 10 мМ глюкозы) и в деполяризующей среде, которая отличалась от среды покоя только содержанием калия и натрия (145 мМ KCl и 5 мМ NaCl). В среде инкубации с соответствующими добавками синапсомы (1 мг белка/мл) выдерживали при 37° в течение 5 мин, после чего в ячейку вводили ^{45}Ca (2 μ Ки·мл), общая концентрация кальция составляла 1 мМ. Через 10 мин после начала инкубации с меткой аликвоты из инкубацион-

ной ячейки фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры («Millipore», США) типа HA с величиной пор 0.45 мкм или через стекловолокнистые фильтры типа GF/B («Whatman», Англия). Фильтры промывали средой, содержащей 0.32 М сахарозу, 3 мМ ЭДТА и 5 мМ трис (рН 7.4), а затем вносили во флаконы со сцинтилляционной смесью. Оценку радиоактивности проводили на счетчике «Rackbeta» («ЛКВ», Швеция).

Степень гидролиза мембранных липидов фосфолипазами оценивали по накоплению продуктов гидролиза с помощью ТСХ. После экстракции смесью хлороформ/метанол (2:1) липиды разделяли на пластинках с силикагелем 60 («Merck», ФРГ) в одномерной системе хлороформ/метанол/вода (65:25:4) и двумерной системе хлороформ/метанол/28%-ный аммиак (65:25:5) и хлороформ/ацетон/метанол/уксусная кислота/вода (30:40:10:10:5). Затем определяли липидный фосфор в каждой фракции [11].

Были использованы следующие реактивы: ^{45}Ca («Amersham», Англия), НЕРЕС, сахараза, трис («Serva», ФРГ), изоптин (гидрохлорид верапамила) («ЛЕК», СФНРЮ), β -форбол (12-О-тетрадеканонилфорбол—13-ацетат) и ЭДТА («Sigma», США), фосфолипаза С из *Bacillus cereus* («Boehringer», ФРГ), фосфатидная кислота («Koch Light», Англия), остальные реактивы отечественного производства.

Фосфолипаза Д из *Streptomyces cinnamomeus* и фосфолипаза С, специфичная к ФИ, из *Bacillus cereus* были выделены и любезно предоставлены нам В. В. Кулене (ВНИИПЭ, Вильнюс). Для получения цитозольной фракции мозг крыс гомогенизировался в гомогенизаторе стекло-стекло в среде выделения, содержащей 50 мМ трис, 1 мМ ЭДТА и 0.5 мМ фенилметилсульфонилфторида, рН 7.4. Гомогенат центрифугировали 30 мин при 13000 г, затем к супернатанту добавляли 1 мМ уксусную кислоту так, чтобы рН раствора становился равным 5.0. Образующийся при этом осадок отделяли центрифугированием при 1000 г в течение 30 мин. Супернатант лиофилизировали. Фосфолипазная активность цитозольной фракции мозга определялась по отношению к ФИ, диспергированным в растворе дезоксихолата (4 мг/мл), в 50 мМ трис-буфере (рН 7.6), содержащем 4 мМ CaCl_2 . Аликвоты из реакционной ячейки объемом 0.15 мл экстрагировали 0.5 мл смеси хлороформ/метанол (2:1) и в них в водной и хлороформной фазе анализировалось содержание фосфора.

Результаты и обсуждение

Транспорт Ca^{2+} внутрь синапсом происходит по градиенту концентраций и в условиях покоя (в среде, содержащей большую концентрацию Na^+), и в условиях, когда трансмембранный потенциал мембран синапсом близок к нулю (в среде деполяризации, содержащей большую концентрацию K^+). В последнем случае поток Ca^{2+} внутрь синапсом вырастает в 2—3 раза [12]. В таблице приведены величины накопления Ca^{2+} внутри синапсом за 10 мин инкубации в присутствии [^{45}Ca].

Блокатор Ca^{2+} -каналов верапамил ($5 \cdot 10^{-4}$ М) ингибирует потенциалзависимое поступление Ca^{2+} в синапсомы в 3,5 раза и несколько понижает уровень накопления Ca^{2+} в среде покоя лишь на 25%.

Задачей данного исследования явилось выяснение возможности прямого воздействия метаболитов ФИ-цикла на потенциалзависимое поступление Ca^{2+} . Для этого изучали действие специфичной к ФИ фосфолипазы С, выделенной из *Bacillus cereus*, на поступление Ca^{2+} в синап-

Таблица

Влияние фосфолипаз и метаболитов ФИ-цикла на поступление Ca^{2+} в синапсомы

Вводимые в среду инкубации вещества	Концентрация добавленных веществ	Наличие в среде инкубации верапамила	Накопление Ca^{2+} в синапсоме (нмоль/мг белка) за 10 мин	
			среда покоя	деполяризующая среда
Контроль	—	—	$6,8 \pm 0,6$	$15,0 \pm 1,0$
Контроль	—	+	$4,4 \pm 0,3$	$4,2 \pm 0,3$
Фосфолипаза С, специфичная к ФИ	1,2 мкг/мл	—	$11,6 \pm 0,6$	$14,8 \pm 0,8$
	1,2 мкг/мл	+	$4,6 \pm 0,4$	не измеряли
	0,6 мкг/мл	—	$9,2 \pm 0,3$	$12,7 \pm 0,5$
Цитозольная фракция гомогената мозга*	0,06 мкг/мл	—	$7,1 \pm 0,7$	$15,0 \pm 1,5$
	200,0 мкг/мл	—	$10,1 \pm 0,5$	$15,0 \pm 1,5$
Фосфолипаза С, неспецифичная	1,0 мкг/мл	—	$6,0 \pm 0,4$	$8,4 \pm 1,1$
	0,1 мкг/мл	—	$7,0 \pm 0,3$	$14,1 \pm 0,8$
Фосфолипаза Д	1 мкг/мл	—	67 ± 7	78 ± 8
	1 мкг/мл	+	56 ± 6	61 ± 6
	0,01 мкг/мл	—	$13,0 \pm 1,5$	$16,5 \pm 1,5$
Фосфатидная кислота	0,01 мкг/мл	+	$6,7 \pm 0,7$	$8,0 \pm 0,8$
	100 мкМ	—	$11,3 \pm 1,1$	$14,0 \pm 1,4$
	100 мкМ	+	$6,1 \pm 0,6$	$5,7 \pm 0,6$
β-форбол	50 нМ	—	$8,2 \pm 0,4$	$18,0 \pm 1,8$
Арахидоновая кислота	10 мкМ	—	$7,0 \pm 0,7$	$16,0 \pm 1,5$
	100 мкМ	—	$20,0 \pm 1,0$	$15,0 \pm 1,5$
	100 мкМ	—	$7,0 \pm 0,7$	$15,0 \pm 1,5$
Олеиновая кислота	100 мкМ	—	$7,0 \pm 0,7$	$15,0 \pm 1,5$
Фосфолипаза А ₂	10 мкг/мл	—	$5,2 \pm 0,5$	$13,0 \pm 1,3$

Примечание. Содержание фосфолипазы С, специфичной к ФИ, в цитозольной фракции гомогената мозга не превышает 5%.

сомы. Данный фермент гидролизует фракцию только ФИ и полифосфоинозитидов с образованием водорастворимых инозитолфосфатов и гидрофобного 1,2-диацилглицерина (1,2-ДАГ). Установлено, что специфичная фосфолипаза С вызывает активацию транспорта Ca^{2+} в концентрациях от 0,1 до 1,2 мкг/мл. Активирующий эффект фосфолипазы С блокировался верапамилом в тех концентрациях, что и потенциалзависимый транспорт Ca^{2+} . В среде деполяризации данная фосфолипаза достоверно не снижала уровень поступления Ca^{2+} в синапсомы (таблица). Необходимо было оценить, гидролизует ли эндогенная фосфолипаза С фракцию ФИ в тех же пределах, в каких это происходит при воздействии физиологических стимулов (например, гормонов или медиаторов). Однако эти попытки не увенчались успехом в связи с тем, что содержание ФИ в нейрональной ткани не превышает 6—8%, а процент гидролиза фос-

фолипидов фосфолипазой данного типа, как оказалось, невелик. Поэтому для приблизительной оценки активности фосфолипаз различных типов, применяемых в данной работе, измеряли процент гидролиза меченых фосфолипидов в составе липосом. В случае специфичной фосфолипазы С помимо определения процента гидролиза ФИ той концентрацией фермента, которая оказывала эффект на Ca^{2+} -транспорт в синапсосомы, необходимо было подтвердить специфичность применяемого препарата. Дело в том, что из одного и того же источника—микроорганизма *Bacillus cereus* можно выделить две фосфолипазы С, различающиеся по специфичности. Поэтому фермент инкубировали одновременно с двумя различными фосфолипидами—фосфатидил- $[\text{^3H}]$ инозитолом, содержащим метку в полярной части молекулы, и с негидролизующимся этим ферментом 1-пальмитоил-2-9-10 $[\text{^3H}]$ -пальмитоилфосфатидилхолином, который содержал метку в гидрофобной части молекулы. После окончания инкубации смесь экстрагировали смесью хлороформ/метанол (2:1) и измеряли наличие радиоактивности в водной и хлороформной фазе. Наличие меченого водорастворимого продукта свидетельствовало об активности специфичной фосфолипазы С, а отсутствие радиоактивности в хлороформной фазе—о том, что исследуемая специфичная фосфолипаза С не содержит в качестве примесей фосфолипазу С, не обладающую такой специфичностью.

При определении активности специфичной фосфолипазы С с помощью липосом, состоящих из ФХ и меченого $[\text{^3H}]$ ФИ оказалось, что в течение 10 мин инкубации с ферментом гидролизует не более 2% ФИ. Если допустить, что активность специфичной фосфолипазы С не изменяется принципиально при переходе от липосом к синапсосоме, то эффект активации Ca^{2+} -транспорта под действием данного фермента получен в условиях очень ограниченного гидролиза фосфолипидов (менее 0,1%) при расчете на их суммарное содержание.

Фосфолипазы из различных источников, несмотря на одинаковую специфичность, могут сильно различаться не только по величине M_r , но и по своим свойствам. Поэтому представлялось целесообразным изучить влияние на Ca^{2+} -транспорт фермента не микробного происхождения, а фосфолипазы С из нейрональной ткани. По данным Irvine и соавт. [13], цитозольная фракция гомогената мозга крыс обладает фосфолипазной активностью, специфичной к ФИ. В данной работе исследовали действие цитозольной фракции гомогената мозга крыс на накопление Ca^{2+} синапсосомами. Действие этой фракции гомогената мозга оказалось идентичным действию специфичной фосфолипазы С из *Bacillus cereus*: в среде покоя накопление Ca^{2+} синапсосомами увеличивалось почти вдвое, а в деполаризирующей среде несколько снижалось по отношению к контролю (таблица). Методом ТСХ на примере липосом различного фосфолипидного состава было установлено, что цитозольная фракция головного мозга крыс гидролизует только ФИ, причем процент гидролиза этих липидов не превышает 10%. При проведении этих экспериментов использовали ФИ, также выделенные из мозга крыс. Таким образом, вне зави-

симости от источника выделения и активности фосфолипазы С, специфичные к ФИ, способны активировать Ca^{2+} -транспорт в нервные окончания в условиях весьма небольшого гидролиза фосфолипидов.

Тем не менее нельзя исключить, что даже ограниченный липолиз синаптических мембран может сопровождаться их деструкцией, в результате чего мембраны могут стать проницаемыми для Ca^{2+} . Такие данные есть для фосфолипазы A_2 [14]. Поэтому представлялось необходимым выяснить, носит ли стимулирующий эффект фосфолипазы специфичный характер по отношению к ФИ или проницаемость для Ca^{2+} возникает при гидролизе и других липидов. Для этого изучали действие на Ca^{2+} -транспорт фосфолипазы С также из *Bacillus cereus*, но обладающей иной специфичностью: этот фермент способен гидролизовать фосфатидилхолин (ФХ) и фосфатидилэтаноламин (ФЭА), но не ФИ (в дальнейшем этот фермент называем неспецифичной фосфолипазой С). Для того, чтобы можно было сопоставлять действие фосфолипаз С различной специфичности, были подобраны такие концентрации неспецифичной фосфолипазы С, при которых процент гидролиза меченого ФХ в составе липосом не превышал 5%. В этих условиях (концентрация неспецифичной фосфолипазы С составляла 0.1 мкг/мл) не наблюдали изменений в накоплении Ca^{2+} как в среде деполяризации, так и в среде покоя. При повышении концентрации данного фермента в среде, когда гидролизовался достаточно высокий процент липидов (20%) в среде деполяризации, наблюдалось снижение накопления Ca^{2+} синаптическими (таблица).

Итак, при исследовании возможности сопряжения между ФИ-циклом и транспортом Ca^{2+} в синаптическую мембрану, который активируется при деполяризации мембран большими концентрациями K^+ , установили различное по направленности действие специфичной к ФИ и неспецифичной фосфолипазы С. Отсюда следует, что накопление в мембране гидрофобного продукта гидролиза только ФИ-1,2-диацилглицерола (ДАГ) ответственно за этот эффект. Следует еще раз отметить, что активация метаболизма ФИ в клетке в физиологических условиях (при появлении сигнала на внешней поверхности плазматической мембраны) осуществляется эндогенной фосфолипазой С, расположенной с цитозольной стороны мембраны. В данной работе постановка эксперимента такова, что дает возможность изучать функциональную активность образующихся в ходе гидролиза гидрофобных продуктов, так как водорастворимые продукты гидролиза переходят во внешнюю среду.

Основные пути дальнейших превращений гидрофобного продукта гидролиза ФИ-1,2-ДАГ и возможные механизмы регуляции внутриклеточной концентрации K^+ продуктами его превращений разобраны в обзорной статье Berridge, Irvine [1]: а) активация 1,2-ДАГ протениназы С и возможное влияние на проницаемость мембран из-за изменений в уровне фосфорилирования белков; б) увеличение внутриклеточной концентрации свободной арахидоновой кислоты, которая может образовываться при содействии 1,2-ДАГ несколькими путями; в) превращение 1,2-ДАГ в

фосфатидную кислоту (ФК), которая, как показано на модельных системах, стимулирует вход Ca^{2+} в липосомы.

Для оценки первой возможности изучали действие на Ca^{2+} -транспорт активатора протеникиназы С β -форболового эфира, который имитирует действие 1,2-ДАГ на этот фермент. Показано, что инкубация синапсом с β -форболовым эфиром ($5 \cdot 10^{-8}$ М) достоверно не изменяла уровень накопления Ca^{2+} в обеих средах. Таким образом, изменение активности протеникиназы С и связанного с этим уровня фосфорилирования белков существенно не влияют на проницаемость мембран для Ca^{2+} в нервных окончаниях.

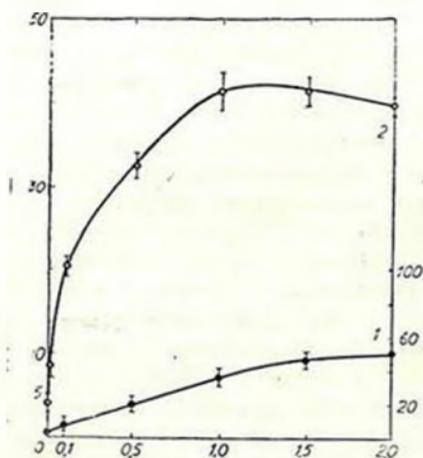


Рис. Влияние фосфолипазы D на транспорт Ca^{2+} в синапсомы. Концентрационные зависимости степени гидролиза мембранных фосфолипидов (1) и накопления ^{45}Ca синапсомы (2). Время гидролиза синапсомных мембран фосфолипазой D — 30 мин. По оси абсцисс — концентрация фосфолипазы D в мкг/мг белка, по оси ординат слева — концентрация Ca^{2+} , пмоль/мг белка, справа — гидролиз фосфолипидов (%)

Для выявления возможной роли ФК, в которую может превращаться 1,2-ДАГ под действием соответствующей киназы, в данной работе было изучено действие ФК и фосфолипазы D на поступление Ca^{2+} в синапсомы, так как этот фермент гидролизует фосфолипиды с образованием ФК. Добавление в среду инкубации, содержащей синапсомы, 100 мкМ ФК вызывает 50% стимуляцию входа Ca^{2+} в среде покоя. В меньших концентрациях ФК была неэффективна. Эти данные хорошо согласуются с ранее полученными результатами [15]. Активация входа Ca^{2+} с помощью ФК блокируется верапамилом ($5 \cdot 10^{-4}$ М). При деполяризации мембран синапсом ФК не влияла на величину накопления Ca^{2+} синапсомы (таблица).

Изучение действия фосфолипазы D на поступление Ca^{2+} в синапсомы в среде покоя показало, что происходит значительное увеличение входа Ca^{2+} , величина которого зависит от концентрации фермента. Эта зависимость описывается кривой, которая выходит на плато в области концентраций фермента 1—2 мкг/мл (рис. 1). Методом ТСХ определили, что в этих условиях содержание ФК в мембране достигает 30—40%, что значительно превышает ее содержание в плазматических мембранах различных животных клеток даже при активации метаболизма ФК раз-

личными агентами [16]. Однако 2-кратное увеличение поступления Ca^{2+} наблюдается уже при добавлении малых концентраций фосфолипазы Д (0,01 мкг/мл), при которых в мембране образуются сравнительно небольшие количества ФК—до 5%. Следует отметить, что как и в случае со специфичной фосфолипазой С, активация транспорта Ca^{2+} в синапсомы низкими концентрациями фосфолипазы Д снимается верапамилом ($5 \cdot 10^{-4}$ М). При больших процентах гидролиза фосфолипидов этим ферментом верапамил несколько снижает действие фосфолипазы Д, но не блокирует его полностью.

При деполяризации синаптической мембраны низкие концентрации фосфолипазы Д (0,02 мкг/мл) не оказывали достоверного стимулирующего эффекта на поступление Ca^{2+} , как и эндогенная ФК в условиях деполяризации. Однако в области концентраций от 0,5 до 1,5 мкг/мл этот фермент существенно повышал накопление Ca^{2+} синапсомы, которое практически не уменьшалось при добавлении верапамила (таблица).

ФК, образующаяся под действием фосфолипазы Д, значительно более эффективна, чем экзогенная ФК, что может быть обусловлено рядом причин. Одна из них—это плохая встраиваемость экзогенной ФК в мембрану синапсомы. Другая—это различия в жирнокислотном составе экзогенной ФК из яиц и ФК, образующейся в мембране синапсомы под действием фосфолипазы Д. Известно, что уровень ненасыщенности жирнокислотных остатков в составе ФК существенным образом влияет на ее способность модифицировать структуру бислоя в модельных мембранах липосом [17].

Тот факт, что стимуляцию Ca^{2+} -транспорта вызывают и экзогенная ФК, и фосфолипаза Д, противоречит предположению Holmes, Yoss [18] о том, что способность ФК активировать перенос Ca^{2+} через мембрану обусловлена наличием продуктов ПОЛ в препарате ФК. Согласно нашим результатам исследований, в которых изучалось слияние липосом и их проницаемость для Ca^{2+} , ФК способна в низких концентрациях (1—2%) ускорять перенос Ca^{2+} через мембрану липосом, но при этом в мембранах должны присутствовать такие типы липидов, которые сами по себе могут образовывать небислоиные структуры [19]. В состав синаптических мембран входит около 30% одного из таких «небислоиных» липидов—фосфатидилэтаноламина, поэтому в синаптической мембране ионофорные свойства ФК в принципе могут реализоваться. Из данных, приведенных в таблице, следует, что эта ситуация наблюдается при достаточно больших процентах содержания ФК в мембране, когда она способна активировать перенос Ca^{2+} в синапсомы и в среде покоя, и при деполяризации. В этих условиях блокирующее воздействие верапамила на этот процесс весьма незначительно. При добавлении же экзогенной ФК или низких концентраций фосфолипазы Д накопление Ca^{2+} синапсомы активируется только в среде покоя.

Для клеток различных тканей известно, что ФИ-цикл сопряжен с каскадом арахидоновой кислоты и при активации метаболизма ФИ уровень арахидоновой кислоты в клетке повышается. Кроме того, для

нейрональной ткани показана активация фосфолипазы A_2 в процессе синаптической передачи, в результате чего высвобождается свободная арахидоновая кислота [20]. Как уже говорилось, 1,2-ДАГ способен активировать этот процесс. Для выявления такого действия 1,2-ДАГ было изучено влияние арахидоновой кислоты на поступление Ca^{2+} в синапсосомы. Показано, что добавление арахидоновой кислоты ($1 \cdot 10^{-4} M$) в суспензии синапсосом оказывало тот же эффект, что и специфичная фосфолипаза C: накопление Ca^{2+} в среде покоя увеличивалось, а в среде деполяризации практически не изменялось. В меньших концентрациях арахидоновая кислота была неэффективна.

Известно, что жирные кислоты, обладающие полярностью-активными свойствами, в больших концентрациях способны индуцировать проницаемость мембран для Ca^{2+} . Именно поэтому фосфолипаза A_2 вызывает вход Ca^{2+} в диксомы [14]. Чтобы выяснить, насколько специфично действие арахидоновой кислоты, в качестве контроля изучали действие двух других жирных кислот (линолевой и олеиновой) и фосфолипазы A_2 . Обе кислоты в концентрации $10^{-4} M$ не оказывали какого-либо эффекта на поступление Ca^{2+} в синапсосомы в обеих средах. Фосфолипаза A_2 в концентрации $10 \mu g/ml$ не уменьшала накопление Ca^{2+} при деполяризации и в среде покоя. Методом ТСХ установили, что при использовании этого фермента в таких концентрациях гидролизуетс \dot{y} до 30% фосфолипидов. На основании этих данных можно высказать предположение о том, что эффект арахидоновой кислоты не связан с хаотрическим действием жирных кислот.

Активация транспорта Ca^{2+} в первые окончания при деполяризации мембраны является начальной стадией синаптической передачи; в отсутствие Ca^{2+} во внешней среде не происходит секреции медиатора [21]. Механизм потенциалзависимого поступления Ca^{2+} в синаптосомы в настоящее время детально не изучен. По-видимому, накопление Ca^{2+} внутри синапсосом, определяемое с помощью ^{45}Ca , является суммарным результатом транспорта Ca^{2+} по потенциалзависимым каналам различных типов (быстрых и медленных) и по механизму Ca^{2+}/Na^{+} обмена. Отсутствие блокирующего действия дигидропиридинов на этот процесс в синапсосомах свидетельствует о том, что эти каналы по своей природе отличаются от таковых в нейроне и в сердечной мышце [22].

Для установления возможности участия метаболитов ФИ (1,2-ДАГ и ФК) в потенциалзависимом поступлении Ca^{2+} в синаптосомы использован фосфолипаза C, специфичную к ФИ, и фосфолипазу D. Обнаруженное усиление транспорта Ca^{2+} под действием этих ферментов и блокирование их действия верапамилом свидетельствует в пользу того, что увеличение содержания метаболитов ФИ в мембране в концентрациях, которые сопоставимы с физиологическими изменениями, действительно может активировать потенциалзависимое поступление Ca^{2+} . Доказательством этого служит и тот факт, что фосфолипаза C, не обладающая специфичностью, не оказывает какого-либо эффекта на транспорт Ca^{2+} .

Механизм влияния исследуемых соединений (1,2-ДАГ и ФК) на

транспорт Ca^{2+} в синапсомы может быть обусловлен способностью этих соединений модифицировать структурную организацию фосфолипидов в мембране. Выше приводились такие данные для ФК, полученные на модельных системах [17]. Аналогичные результаты были получены нами при исследовании структуры липосомальных мембран, содержащих низкие (1—2%) концентрации 1,2-ДАГ [23]. По-видимому, в биологических мембранах, где проницаемость для Ca^{2+} определяется функциональней активностью каналов, имеющих белковую природу, кратковременное повышение концентрации метаболитов ФИ индуцирует изменение структурной организации липидного окружения канала, тем самым влияя на его функциональную активность.

COUPLING OF PHOSPHATYDILINOSITOL CYCLE TO Ca^{2+} TRANSPORT THROUGH RAT BRAIN SYNAPTOSOMAL MEMBRANES

SELISHCHEVA A. A., BRUSOVANIK V. I., KRAVTSOV G. M.,
SCHRAGIN A. S., KOZLOV Yu. P.

M. V. Lomonosov State University, Moscow, USSR

The effects of phosphatidylinositol cycle on potential-dependent Ca^{2+} -influx into rat brain synaptosomes were studied. Treatment of synaptosomes by phosphatidylinositol-specific phospholipase C resulted to an increase in synaptosomal Ca^{2+} content in the medium maintaining the transmembrane potential of synaptosomes. If synaptosomes were treated with specific phospholipase C in the depolarizing medium, no increase in Ca^{2+} transport was observed. Phosphatidic acid, phospholipase D at low concentrations and arachidonic acid produced the same effects as phospholipase C. Verapamil (a blocator of potential-dependent Ca^{2+} -channels) decreased or even completely abolished activating effects of all the compounds used. Phospholipase A at high concentrations stimulated Ca^{2+} influx into synaptosomes both in absence and in presence of transmembrane potential. Treatment with non-specific phospholipases A_2 and C, as well, as with -phorbol or oleic and linolic acids did not lead to any changes in Ca^{2+} -transport into synaptosomes.

The results presented allow us to conclude that synaptosomal membrane permeability to Ca^{2+} ions is in some way coupled to phosphatidylinositol metabolism.

ЛИТЕРАТУРА

1. Berridge M. J., Irvine R. F. *Nature*, v. 312, p. 315—321, 1984.
2. Cooper R. H., Cell K. E., Williamson J. R. *J. Biol. Chem.*, v. 260, № 6, p. 3281—3288, 1985.
3. Lapetina E. J. *Life Sci.*, v. 3, № 11, p. 1011—1018, 1984.
4. Brown E., Kendall D. A., Nahorski S. I. *J. Neurochem.*, v. 42, p. 1379—1387; 1984.

5. Hawthorne J. N. Mol. Cell. Biochem., v. 8, p. 83—86, 1975.
6. Rickard M. R., Hawthorne J. N. J. Neurochem., v. 30, p. 145—152, 1978.
7. Atlas N.—lu: Hight light in the reception. Amsterdam, Pergamon Press, 1983.
8. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485—489, 1975.
9. Fleming L. H., Hodach A. E., Reynolds N. S. Brain Res., v. 202, № 2, p. 469—473, 1980.
10. Bradford M. M. Anal. Biochem., v. 72, № 2, p. 248—254, 1976.
11. Vaskovsky V., Kostetsky E. J., Vasendin I. V. J. Chromatogr., v. 114, № 1, p. 129—141, 1975.
12. Blaustein M. P., Ector A. C. Biochim. et biophys. acta, v. 419, № 2, p. 295—308, 1976.
13. Irvine R. F., Hemington N., Dawson R. M. C. Eur. J. Biochem., v. 99, № 3, p. 525—530, 1979.
14. Okimasu E., Shtruishi N., Kobayashi S. FEBS Lett., v. 145, p. 82—86, 1982.
15. Harris R. A., Schmidt J., Hitzemann B. A., Hitzemann R. J. Science, v. 212, № 4500, p. 1290—1291, 1981.
16. Bogg J. M. Can. J. Biochem., v. 58, № 10, p. 756—770, 1980.
17. Kouyouct R., Silvius J. R., Graham J., Pezolet M. Biochemistry, v. 24, p. 7132—7140, 1985.
18. Holmes R. P., Yoss N. L. Nature, v. 305, p. 223—224, 1983.
19. Шрагин А. С., Василенко И. А., Селищова А. А., Шосу В. И. Докл. АН СССР, т. 281, вып. 1, с. 223—226, 1986.
20. Moskowitz N., Puzskln S., Schook W. J. Neurochem., v. 41, p. 1576—1586, 1983.
21. Katz B., Miledt R. J. Physiol (London), v. 195, p. 481—491, 1968.
22. Сребн J. A., Karobath M. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 134, № 3, p. 1038—1047, 1981.
23. Шрагин А. С., Василенко И. А., Селищова А. А., Шосу В. И. Биол. мембраны, т. 2, вып. 8, с. 789—794, 1985.

Поступила 15. V 1988



УДК 612.822.1:615.832.9

РЕЦЕПТОР-ЛИГАНДНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В СТРУКТУРАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ГИПОТЕРМИИ

ЧИЖЕВСКАЯ И. В., ШИФМАН М. И., БАБИЧУК Г. А.

Институт проблем криобиологии и криомедицины АН УССР, Харьков

В статье рассматривается влияние умеренного охлаждения на нейрорегуляторные процессы коры и гипоталамуса головного мозга крыс. Показано, что умеренная кранио-церебральная гипотермия ($30-32^\circ$) оказывает заметное влияние на пре- и постсинаптические процессы адренергической передачи в ЦНС. Существенную роль в механизмах терморегуляции в условиях гипотермии играет не только динамика высвобождения и обратного захвата норадреналина и серотонина, но и кинетика рецепторного опосредования действия терморегуляторных нейротрансмиттеров. На фоне наркоза умеренная кранио-церебральная гипотермия повышает аффективность связывания лигандов адренорецепторами.

Известно, что гипотермия приводит к активации центральных адренергических структур, высвобождению нейромедиаторов и возбуждению гипоталамических центров, контролирующей кортикотропную функцию гипофиза [1, 2]. В настоящее время значительный интерес представляет изучение взаимоотношения нейромедиаторов, типа рецепторов, через который опосредуют свое действие терморегуляторные нейротрансмиттеры в ЦНС, а также кинетических характеристик рецепторных взаимодействий при кранио-церебральной гипотермии (КЦГ).

Адренергические рецепторы в ЦНС влияют на выделение гормонов гипофиза и являются одним из звеньев регуляции гомеостаза, например, температуры, кровяного давления. Постсинаптические α_1 -адренорецепторы (АР) в целом медируют реакции возбуждения (например, сужение сосудов), а пресинаптические α_2 -АР—тормозящее воздействие (уменьшение высвобождения норадреналина (НА) во время раздражения нерва) [9]. На фоне наркоза умеренные уровни охлаждения (температура тела $30-32^\circ$) способны обеспечить блокаду ЦНС.

Целью наших исследований было изучение влияния умеренного охлаждения на нейрорегуляторные процессы, а именно: на высвобождение [^3H]НА и обратный захват [^3H]серотонина (5-ОТ), кинетику радиолигандного связывания адренергических (α_1 , α_2 и β), а также имипрамино-вых рецепторов. Изучение сопряженных с адезилатциклоазой β -АР дает

возможность проследить не только изменение кинетики рецепторного связывания, но также динамику изменения физиологического ответа—по включению системы «вторичных мессенджеров» как следующего звена в цепи опосредования нейротрансмиттерной информации. Изучение этих процессов, по-видимому, способно дать представление об изменении процессов нейротрансмиттерной передачи в структурах головного мозга при КЦГ.

Материалы и методы

КЦГ наркотизированным крысам проводили на установке для программного охлаждения, созданной в Институте проблем криобиологии и криомедицины АН УССР. Ректальная температура (T_p^0) 34° соответствовала поверхностной гипотермии, T_p^0 30 — 32° —умеренному охлаждению. Используемый в эксперименте наркоз—20% γ -оксимасляная кислота (0,5 мл/100 г массы) + 5% тиопентал натрия (0,1 мл/100 г массы)—внутрибрюшинно.

Исследования проводили на 4-х экспериментальных группах: I—интактные животные; II—наркотизированные животные без охлаждения; III—животные с поверхностной гипотермией (T_p^0 34°); IV—животные с умеренной гипотермией (T_p^0 30 — 32°).

Из коры и гипоталамуса головного мозга крыс получали препарат синапсом по методу Hajos [3]. Препарат синаптических мембран из тех же структур получали ранее описанным способом [4]. Кинетические характеристики (K_d и количество мест связывания— B_{max}) адренорецепторов получали методом равновесного связывания меченых соединений с препаратом мембран синапсом. Реакционная смесь содержала 400 мкл суспензии мембран ($\approx 500\mu$) в 50 мМ трис-НСI буфере (рН 7,4), 50 мкл меченого лиганда и 50 мкл немеченого (или трис-НСI буферного раствора) на каждую пробирку. Связывание α_1 и α_2 адренорецепторов проводили [3H] WB 4101 и [3H]нохимбином соответственно, связывание β -АР [3H]дигидроальprenололом происходило в присутствии 10 мМ $MgCl_2$, имипраминовых рецепторов—[3H]имипрамином в присутствии 120 мМ NaCl+5 мМ KCl. Разделение связанного и свободного лиганда проводили методом вакуумного фильтрования через стекловолокнистые фильтры GF/C («Whatman», Англия) при температуре 0 — $+4^\circ$. Величину специфического связывания определяли по разнице между уровнем связывания в отсутствие и в присутствии немеченого лиганда. Анализ кривых связывания в координатах Скэтчарда [5, 6] проводили с учетом модели комплексообразования лигандов с несколькими типами центров связывания.

Активность аденилатциклазной системы (АЦ-системы) определяли по скорости накопления сАМР в препарате синаптических мембран [7]. Конечную концентрацию сАМР определяли, используя стандартный набор реактивов «Cyclic AMP-assay Kit» («Amersham», Англия).

Изучение транспорта нейромедиаторов проводили путем инкубации

синапсом (3,5 мин при 37°) в солевом буфере Кребса-Рингера с [³H]нейромедиаторами (конечные концентрации—0,1—1,0 мкМ). Процесс аккумуляции нейромедиаторов останавливали добавлением 5 мл буфера и последующей быстрой фильтрацией через мембранные фильтры «Супрог-5» (диаметр пор—0,45 мкм), которые дважды промывали 0,15 М NaCl. Концентрацию меченого медиатора определяли измерением радиоактивности. Кинетические параметры захвата— K_{in} и максимальную скорость захвата (V_{max})—вычисляли по методу наименьших квадратов [8].

Для изучения K^+ -индуцированного высвобождения [³H]нейромедиаторов синапсосомы, «нагруженные» мечеными медиаторами, из инкубационной среды переносили аликвотами по 0,5 мл на стеклофильтры «Whatman GF/C» и промывали деполяризующим раствором Кребса-Рингера с концентрацией ионов калия 60 мМ. Высвобождение [³H]нейромедиаторов определяли как разность значений радиоактивности фильтров контроля, то есть промытых обычным раствором Кребса-Рингера, и фильтров, промытых деполяризующим раствором.

Результаты и обсуждение

Динамика изменений кинетических параметров α -рецепторов по диаграмме (рис. 1) указывает на то, что в условиях наркоза понижается сродство лигандов к рецепторам (особенно резко это выражено в случае α_1 -АР). K_d возрастает примерно в 3 раза. При анализе кривых связывания в координатах Скэтчарда при температуре 32° график для α_1 -АР имеет нелинейный характер (рис. 2), что говорит о наличии двух популяций данного типа рецепторов с различными K_d (рис. 1). Если общую

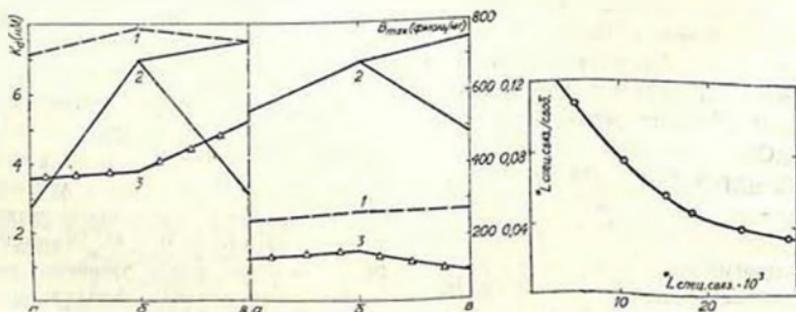


Рис. 1. Влияние краниоцеребральной гипотермии (КЦГ, 32°) на параметры связывания [³H]нохимбина (α_2 -АР, 1), [³H]WB 4101 (α_1 -АР, 2) [³H]имипрамина (имипраминоус Р, 3) препаратом мембран синапсом коры и гипоталамуса головного мозга крыс: а—норма, б—контроль наркоза, в—КЦГ—32°

Рис. 2. Анализ кривых связывания [³H]WB 4101 препаратом мембран синапсом коры и гипоталамуса головного мозга крыс в координатах Скэтчарда (серия КЦГ—32°)

популяцию рецепторов принять за 100%, то количество рецепторов с высокой степенью сродства составит примерно 40%. Для α_2 -АР, осуществляющих пресинаптическую регуляцию секреции НА, такой динамики не наблюдается. Это коррелирует с тем, что и суммарный уровень секреции НА в том же режиме гипотермии практически возвращается к исходным цифрам (рис. 3).

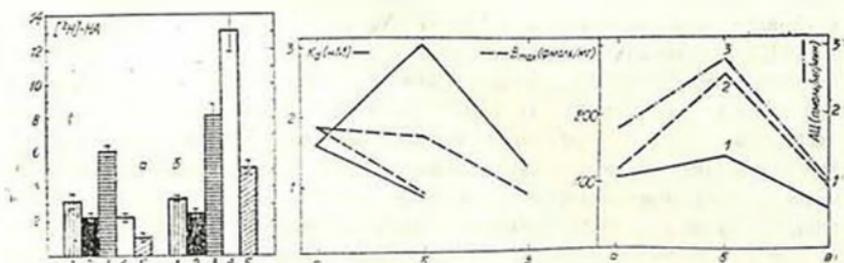


Рис. 3. Высвобождение $[^3H]$ норадреналина ($\times 10^4$ имп/мин/мг белка) синяпсомами коры (а) и гипоталамуса (б) головного мозга крыс в динамике КЦГ: 1—норма, 2—контроль наркоза, 3—начало охлаждения (15 мин), 4—КЦГ—34°, 5—КЦГ—30°

Рис. 4. Корреляция между характеристиками связывания $[^3H]$ дигидроал-преклола препаратом мембран синапсом коры и гипоталамуса головного мозга крыс (слева) и активностью аденилатциклазной системы (справа) и том же препарате без эффекторов (1), в присутствии 10^{-5} М изопро-теринола (2) и 10 мМ NaF (3); а—норма, б—контроль наркоза, в—КЦГ—32°

Появление двух популяций α_1 -рецепторов при гипотермии (или при наркозе без охлаждения, как будет показано ниже для β -АР) может объясняться модификацией липидного окружения рецепторов таким образом, что насыщенность связывания неспецифическими компонентами будет находиться в пределах концентраций K_d и, следовательно, вытесняться 100-кратными концентрациями немеченого лиганда. График Скэтчарда при этом будет также нелинейен. Возможно, это отражает также разнонаправленный характер изменений кинетики радиолигандного связывания в коре и гипоталамусе, так как в данном эксперименте мы объединили мембраны этих структур. Кроме того, появление популяций рецепторов с высоким и низким сродством может быть проявлением функциональной неоднородности рецепторов одного и того же фармакологического типа, что хорошо объясняется с позиций теории «кластеризации» [10].

Для β -АР нелинейный график Скэтчарда появляется во II экспериментальной группе. Доля рецепторов с высокой степенью сродства составляет 35%. При гипотермии популяция рецепторов с низким сродством исчезает, а значение K_d понижается до более низкого уровня, чем у интактных животных, однако и количество мест связывания уменьшается вдвое по сравнению с нормой (рис. 4).

Сопоставляя полученные данные с динамикой высвобождения [3H]НА структурами коры и гипоталамуса (рис. 3), мы видим, что на начальных этапах охлаждения (в коре и гипоталамусе) и на уровне $T_p - 34^\circ$ (в гипоталамусе) происходит массивный выброс НА. Полученные результаты можно интерпретировать как явление десенсibilизации рецепторов в результате довольно длительного контакта с высокими концентрациями агониста. Для подтверждения этого вывода была исследована каталитическая активность АЦ-системы, сопряженной с β -АР.

Представленная диаграмма (рис. 4) демонстрирует показатели активности аденилатциклазы, выраженные в пмоль сАМР/мг белка/мин в присутствии изопротеринаола (10^{-5} М), NaF (10 мМ) и без применения афферторов. Наркоз усиливает степень активации АЦ-системы агонистом β -АР—изопротеринаолом, что коррелирует с появлением в этой серии эксперимента популяции рецепторов с высокой степенью сродства. Это снимает предположение о псевдоспецифике второй популяции мест связывания и говорит лишь о функциональной неоднородности β -АР. Отсутствие стимуляции АЦ-системы после применения КЦГ подтверждает вывод о десенсibilизации β -АР, сопряженных с аденилатциклазой, в той же экспериментальной серии.

Таблица

Кинетические параметры захвата [3H]серотонина синаптическими
кора и гипоталамуса головного мозга крыс

Серия эксперимента	К о р а		Гипоталамус	
	K_m	V_{max}	K_m	V_{max}
Интактные животные	$0,26 \pm 0,05$	$15,61 \pm 1,62$	$0,69 \pm 0,02$	$16,94 \pm 1,20$
Наркогизированные животные без охлаждения	$0,58 \pm 0,15$	$21,36 \pm 5,19$	$1,72 \pm 0,47^*$	$21,01 \pm 4,93$
Животные с поверхностной гипотермией ($T_p - 34^\circ$)	$0,56 \pm 0,36$	$16,84 \pm 6,23$	$0,34 \pm 0,03^{**}$	$23,44 \pm 3,14$
Животные с умеренной гипотермией ($T_p - 32^\circ$)	$2,58 \pm 0,44^{**}$	$113,64 \pm 18,13^{**}$	$0,52 \pm 0,06^{**}$	$26,18 \pm 4,3$

Примечание. K_m —в мМ, V_{max} —в пмоль/мг белка/мин; различия по сравнению с контролем достоверны, * $p < 0,05$; различия по сравнению с контролем наркоза достоверны, ** $p < 0,05$

Феномен десенсibilизации является доказательством конформационных переходов в рецепторных белках [11]. Активация АЦ-системы NaF осуществляется посредством образования каталитически активного комплекса: N-белок-каталитическая субъединица аденилатциклазы (С) [12]. Согласно моделям Cassel, Selinger [12, 13], активация аденилатциклазы под влиянием медиаторов осуществляется через образование двойных белковых комплексов: рецептор—N-белок, затем—N-белок-С. При гипотермии на уровне $T_p - 32^\circ$ стимуляция АЦ-системы NaF отсутствует. Следовательно, можно полагать, что КЦГ является фактором, модулиру-

ющим не только изменения в рецепторных белках, но и угнетающим функциональную активность GTP-связывающего белка (N-белка) в звене N-белок-С.

Для более полной характеристики пресинаптических механизмов процесса нейротрансмиссии были исследованы кинетические параметры связывания имипраминовых рецепторов, соответствующих местам обратного захвата 5-ОТ и кинетика обратного захвата [^3H]5-ОТ синапсосомами коры и гипоталамуса (рис. 1, таблица).

КЦГ (34°) приводит к уменьшению K_m захвата [^3H]5-ОТ синапсосомами, выделенными из гипоталамуса, по сравнению с контролем наркоза на 81%, то есть к возрастанию специфичности переносчика. Таким образом, гипотермия как бы нивелирует действие наркоза на процессы захвата. С понижением температуры тела специфичность переносчика падает примерно в 1,5 раза, а V_{max} имеет тенденцию к повышению, то есть эти процессы компенсируются, и захват остается практически на прежнем уровне.

Привлекает особое внимание динамика изменения процессов захвата [^3H]5-ОТ в коре. Кинетические параметры обратного захвата [^3H]5-ОТ синапсосомами коры под действием наркоза и начального этапа охлаждения меняются незначительно. Умеренная гипотермия приводит к резкому увеличению K_m и V_{max} [^3H]5-ОТ. При тех же экспериментальных условиях в аналогичном препарате синаптических мембран происходит некоторое уменьшение сродства и мест связывания имипраминовых рецепторов (рис. 1). Полученные результаты могут являться следствием уменьшения числа высокоаффинных переносчиков 5-ОТ и появления новой популяции переносчиков с низким сродством к субстрату как проявление компенсаторного механизма для сохранения системы захвата 5-ОТ. Столь резкие различия кинетических параметров обратного захвата [^3H]5-ОТ в структурах коры и гипоталамуса связаны, по-видимому, с тем, что при температуре тела 30° перепад температур между корой и гипоталамусом составлял 4° , то есть кора подвергается более интенсивному холодному воздействию.

Таким образом, при КЦГ происходят взаимообусловленные изменения синаптических процессов, находящиеся в зависимости от температуры охлаждения. Наркоз и гипотермия вносят существенные изменения в кинетику пре- и постсинаптических процессов адренергической передачи в ЦНС. В рецепторном звене динамика этих изменений различна для каждого типа рецепторов. Общей закономерностью является в той или иной степени выраженное повышение специфичности рецепторов к лигандам (по сравнению с группой контроля наркоза) после применения гипотермии. Кроме того, КЦГ способна модулировать конформационные перестройки в рецепторных белках.

RECEPTOR-LIGAND INTERACTIONS IN RAT BRAIN STRUCTURES DURING HYPOTHERMIA

CHIZHEVSKAJA I. V., SHIFMAN M. I., BABIYCHUK G. A.

Institute of Cryobiology and Cryomedicine Problems, Uk. SSR Acad. Sci., Kharkov

The effect of moderate cooling on the neuroregulatory processes in rat brain cortex and hypothalamus has been considered. Craniocerebral hypothermia (30–32°C) exerted marked influence on pre- and postsynaptic processes of adrenergic transmission in CNS. The role of dynamics of noradrenaline and serotonin secretion, reuptake and kinetics of receptor binding in thermoregulation mechanisms appeared to be significant. Against a background of anesthesia the moderate craniocerebral hypothermia increased the effectiveness of ligand binding.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сааков Б. А., Еремина С. А., Межера Э. П.—В сб.: Теоретические проблемы действия низких температур на организм, с. 154–162, Владимир, 1972.
2. Шифман М. И., Марченко В. С. Криобиология, № 4, с. 47–48, 1986.
3. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 483–489, 1975.
4. Зайцев С. В., Курочкин И. Н., Сергеева М. Г., Варфоломеев С. Д. Биохимия, т. 49, № 7, с. 1127–1133, 1984.
5. Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. Кинетические методы в биохимических исследованиях, М., изд-во МГУ, 1982.
6. Klotz Irving M. Science, v. 217, p. 1247–1249, 1982.
7. Ткачук В. А., Балденков Г. Н. Биохимия, т. 43, с. 1097–1110, 1978.
8. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики, М., Мир, 1979.
9. Ланге С. Э.—В кн.: Освобождение катехоламинов из адренергических нейронов, с. 59–82, М., Медицина, 1982.
10. Восйков В. А. Итоги науки и техники, № 2, с. 141–190, 1984.
11. Глбова Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов, М., Медицина, 1978.
12. Ткачук В. А. Укр. биохим. журн., т. 53, № 2, с. 5–27, 1981.
13. Cassel D., Sellinger Z. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., v. 75, № 9, p. 4155–4159, 1978.

Поступила 6. V 1988



УДК 612.82+612.766.2

ВЛИЯНИЕ ДЛИТЕЛЬНОГО КОСМИЧЕСКОГО ПОЛЕТА НА СОДЕРЖАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ КОМПОНЕНТОВ В ГОЛОВНОМ МОЗГУ КРЫС

ТИГРАНЯН Р. А., *ДЕМИН Н. Н., КОВАЛЕВ В. Ю.

Институт по стандартизации и контролю лекарственных средств МЗ СССР,
Москва; *Институт физиологии им. И. П. Павлова АН СССР, Ленинград

В различных отделах головного мозга крыс (продолговатый мозг, мозжечок, гипоталамическая область и большие полушария), находившихся в течение 18,5 суток в условиях космического полета на биоспутнике «Космос-1129», исследовали содержание специфических компонентов нервной ткани—гомокарнозина, путресцина и 1-цистатионина. Показано, что длительный космический полет сопровождался изменениями концентрации специфических компонентов, наиболее выраженными в гипоталамической области. Высказывается заключение о том, что выявленные изменения являются результатом хронического стресса, связанного с воздействием невесомости.

В условиях длительных космических полетов в ЦНС крыс нами были обнаружены определенные изменения в системе биосинтеза белка и нуклеиновых кислот, которые объяснялись как влиянием невесомости, так и воздействием различных стрессорных факторов, сопровождающих космический полет [1—4]. Эти изменения, обусловленные, по всей вероятности, сдвигами в системах регуляции процессов биосинтеза белка и нуклеиновых кислот, могли отразиться и на содержании в мозгу таких низкомолекулярных нейромодуляторов, как полиамины и некоторые специфические компоненты.

Проведенное нами изучение содержания полиаминов в различных отделах головного мозга крыс после завершения 18,5-суточного полета на биоспутнике «Космос-1129» показало, что космический полет сопровождался изменениями содержания полиаминов (путресцина, спермина и спермидина), наиболее выраженными в продолговатом мозгу, причем более всего изменялась концентрация путресцина, менее всего—спермина [5].

Гомокарнозин, путресцин и 1-цистатионин в основном содержатся в головном мозгу, в связи с чем и получили название его специфических компонентов. Они играют важную роль в биохимических процессах, происходящих в ЦНС [6—8]. Метаболизм специфических компонентов тесно

связан с обменом полиаминов в мозгу [9—11]. Целью настоящей работы было изучение содержания специфических компонентов в различных отделах головного мозга крыс после завершения космического полета на биоспутнике «Космос-1129».

Материалы и методы

Исследования проводили на крысах-самцах линии *Wistar* колонии SPF (Братислава, ЧССР) с начальной массой 220 ± 5 г. Условия содержания и кормления животных в космическом полете описаны ранее [12]. Данные, полученные при исследовании летавших крыс, сравнивали с результатами опытов, проведенных на двух контрольных группах животных—у интактных крыс (виварийный контроль) и у животных в модельном эксперименте, повторившем на Земле все условия жизни и содержания крыс в полете, кроме невесомости (синхронный контроль). Животных подвергали эвтаназии через 6—8 ч после приземления и на 6-е сутки после завершения полета. Часть животных, обследованных на 6-й день после полета, была подвергнута 5-кратной иммобилизации (по 150 мин ежедневно): контрольная и синхронная группы крыс также были подвергнуты повторяемой иммобилизации. Иммобилизацию проводили по усовершенствованному методу Selye [13]. В каждой опытной и контрольной группе было по 6—7 животных. Мозг исследовали после выделения различных его отделов—больших полушарий, мозжечка, продолговатого мозга и гипоталамической области—по специальной схеме [14]. В супернатантах, полученных при центрифугировании гомогенатов из исследованных отделов мозга при 11000 об/мин в течение 15 мин при температуре $+4^\circ$, определяли концентрацию гомокарнозина [15], путреина [16] и l-цистатинина [17]. Полученные данные рассчитывали на единицу белка [18]. Статистическую достоверность вычисляли при помощи t-теста Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Сразу после завершения эксперимента в продолговатом мозгу отмечалось снижение содержания гомокарнозина у животных полетной и синхронной групп по сравнению с виварийным контролем. В мозжечке концентрация гомокарнозина повысилась у крыс полетной и синхронной групп по отношению к контролю, в то время как содержание путреина, превысившее у животных синхронного эксперимента уровень виварийного контроля, у летавших крыс было заметно ниже контрольных величин. В гипоталамической области наблюдалось снижение концентрации гомокарнозина и путреина у животных синхронного эксперимента и особенно у полетных крыс, в то время как содержание l-цистатинина у животных синхронной и особенно полетной групп превысило контрольный уровень. В больших полушариях мозга не было выявлено изменений концентрации специфических компонентов у летавших и синхронных крыс по сравнению с контрольными величинами (рис., слева).

Через 6 суток после завершения эксперимента в продолговатом мозгу содержание гомокарнозина у полетных животных значительно превысило уровень показателей контрольных групп, а уровень путреанина у крыс синхронной группы понизился. В мозжечке концентрация гомокарнозина у крыс синхронного эксперимента заметно повысилась, содер-

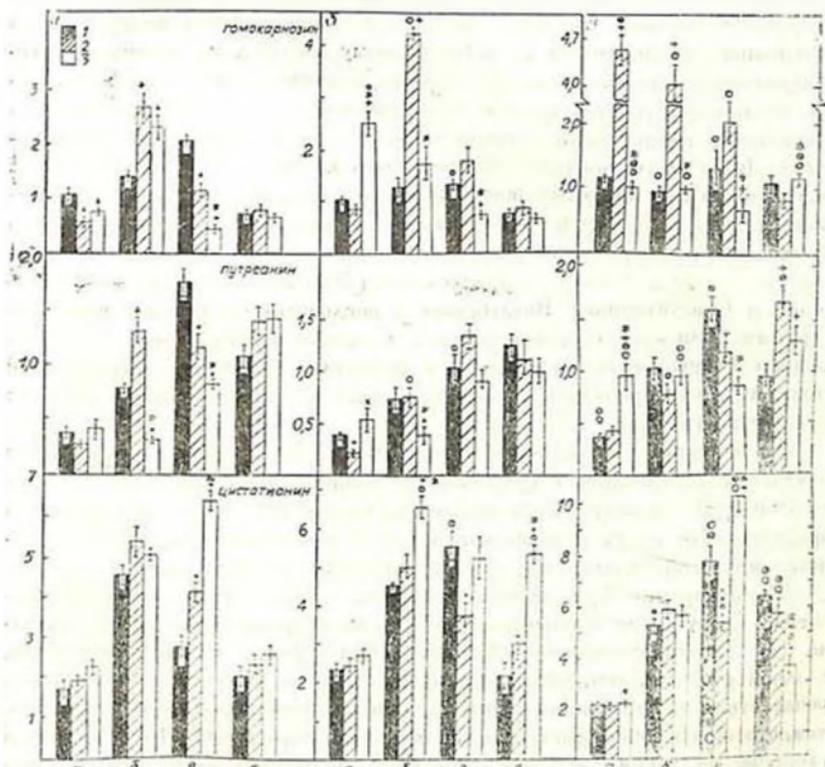


Рис. Содержание специфических компонентов (нмоль/г белка) в различных отделах головного мозга крыс сразу после завершения полета (слева), через 6 суток после полета (в центре), подвергнутых после приземления повторной иммобилизации через 6 суток после завершения полета (справа). 1—ивариантный контроль, 2—синхронный контроль, 3—полет; а—продолговатый мозг, б—мозжечок, в—гипоталамическая область. (+)—достоверные отличия от 1; (-)—достоверные отличия между 3 и 2; (⊕)—отличия между животными на 6-е сутки после завершения полета и такими же животными, подвергнутыми иммобилизации; (○)—отличия по сравнению с животными сразу после приземления

жание путреанина у летавших животных снизилось, а уровень L-цистадонина у крыс полетной группы превысил контрольные величины. В те же сроки в гипоталамической области выявилось понижение концентрации гомокарнозина у летавших животных и уменьшение содержания

1-цистатионина у крыс синхронного эксперимента. В больших полушариях мозга отмечалось значительное возрастание концентрации 1-цистатионина у полетных животных по сравнению с показателями контрольных групп (рис., в центре).

Повторяемая иммобилизация, воздействующая на животных в постэкспериментальном периоде, привела в продолговатом мозгу у крыс синхронного эксперимента к значительному повышению содержания гомокарнозина, в то время как у полетных животных отмечалось выраженое увеличение уровня путреанина. В мозжечке при этом наблюдалось возрастание концентрации гомокарнозина у крыс синхронного эксперимента. В гипоталамической области повторяемый иммобилизационный стресс привел у полетных животных к повышению содержания 1-цистатионина при одновременном уменьшении концентрации гомокарнозина и путреанина, в то время как у крыс синхронной группы при этом наблюдалось возрастание уровня гомокарнозина и снижение содержания путреанина и 1-цистатионина. Воздействие в послеполетном периоде повторяемой иммобилизации сопровождалось в больших полушариях мозга повышением концентрации путреанина у животных полетной и синхронной групп при одновременном снижении уровня 1-цистатионина у летавших крыс (рис., справа).

Проведенные исследования показывают, что наиболее выраженные изменения содержания специфических компонентов отмечались в гипоталамической области. Содержание 1-цистатионина мало изменялось в продолговатом мозгу и мозжечке, но зато в больших полушариях и гипоталамической области претерпело значительные изменения.

Концентрация 1-цистатионина во всех отделах мозга летавших животных сразу после приземления повышалась, причем наиболее выражено в гипоталамической области. Этот факт можно объяснить с одной стороны, тем, что в момент наиболее выраженного стрессорного воздействия концентрация этого соединения может возрасти в связи с тем, что оно способно выступать как медиатор торможения [19]. С другой стороны, во время развития адаптивных процессов увеличивается миелинизация нейронов мозга, в которой также участвует 1-цистатионин [20].

6-суточная реадаптация к условиям земной гравитации привела лишь к частичной нормализации концентрации специфических компонентов в различных отделах головного мозга. Схожесть результатов исследований, полученных сразу после приземления и на 6-е сутки после полета, по-видимому, можно объяснить продолжающимся действием адаптационных сдвигов метаболизма, наступивших в организме животных во время космического полета. В то же время данные, полученные на 6-е сутки послеполетного периода, показали различие концентрации специфических компонентов в исследованных отделах мозга у крыс полетной и синхронной групп, за исключением 1-цистатионина, содержание которого в обеих группах изменялось односторонне. Причиной такого расхождения, очевидно, является проявление воздействия невесомости—фактора, который невозможно длительно воспроизвести на Земле и, следовательно,

в синхронном модельном эксперименте. Нам представляется, что сходство результатов исследований у животных полетной и синхронной групп сразу после завершения эксперимента, по всей вероятности, можно объяснить и тем, что изменения уровня специфических компонентов оказались синхронизированными на фоне выраженного эмоционального стресса у крыс, связанного с приземлением биоспутника.

Повторяемая иммобилизация в послеполетном периоде, использованная для выяснения вопроса о характере стрессорной реакции у летавших животных, показала, что различные отделы головного мозга полетной группы крыс по-разному реагировали на иммобилизационный стресс. Сравнение с результатами, полученными нами при исследовании содержания специфических компонентов в различных отделах головного мозга крыс при воздействии иммобилизации на Земле [21], позволяет заключить, что факторы космического полета воздействовали на ЦНС крыс как хронический стрессогенный импульс.

Концентрация 1-цистатионина у летавших животных во всех отделах головного мозга была в основном близка к контрольным значениям или же превышала их. Тот факт, что не было зафиксировано снижения содержания этого специфического компонента нервной ткани при воздействии экстремальных факторов космического полета и последующей адаптации к условиям земной гравитации, очевидно, объясняется, с одной стороны, участием 1-цистатионина в процессах миелинизации и, с другой—ролью этого соединения как медиатора торможения [6, 19, 20]. Снижение содержания 1-цистатионина в больших полушариях мозга у полетных животных, подвергнутых повторяемой иммобилизации, трудно объяснить.

Интересно отметить, что во всех исследованных отделах мозга как сразу после завершения эксперимента, так и на 6-е сутки постэкспериментального периода изменения концентрации полиаминов [5] в основном соотносились противоположно направленными изменениями содержания специфических компонентов мозга. Подобная взаимосвязь изменений концентрации полиаминов и специфических компонентов, по-видимому, объясняется тем, что специфические компоненты являются продуктами распада полиаминов [10, 11].

Экспериментальные данные, полученные при воздействии стрессоров различной природы, свидетельствуют о том, что изменения концентрации специфических компонентов в головном мозгу проявляются у животных почти сразу же после попадания их в непривычные условия жизнедеятельности и не зависят от силы неблагоприятного воздействия [21, 22]. Исходя из этого, можно, по всей вероятности, объяснить послеполетные изменения содержания специфических компонентов как результат длительной ступенчатой адаптивной реакции, развивающейся в условиях постоянного воздействия факторов космического полета. Процессы адаптации, по-видимому, начинают проявляться при попадании животных в необычные условия жизнедеятельности, то есть в условия космического полета.

Важная роль специфических компонентов и полиаминов в жизнедеятельности нервных клеток, а также наличие противоположно направленных изменений в концентрации этих соединений наводят на мысль о существовании одной из возможных сторон адаптационных процессов метаболизма в головном мозгу при действии экстремальных факторов космического полета. Действие этого адаптационного процесса, как нам представляется, осуществляется следующим образом. Когда стрессор воздействует на организм, раздражение передается в лимбическую систему, а от нее — по отделам головного мозга, вызывая катаболизм белков, распад полиаминов и связанное с этим усиление образования специфических компонентов, которые, оказывая нейродепрессивное воздействие на лимбическую систему, вызывают прекращение передачи возбуждения от нее в отделы мозга. Благодаря этому нормализуется биосинтез белков, увеличивается синтез полиаминов и уменьшается содержание специфических компонентов.

THE EFFECT OF PROLONGED SPACE FLIGHT ON THE CONTENT OF SPECIFIC COMPONENTS IN RAT BRAIN

TIGRANYAN R. A., *DOEMIN N. N., KOVALEV V. Yu.

Institute for Standardization and Control of Drugs, USSR Ministry of Health, Moscow

*I. P. Pavlov Institute of Physiology, USSR Acad. Sci., Leningrad

It has been found that rather prolonged (during 18,5 days) space flight (aboard bio-satellite „Cosmos—1129“) was accompanied by variously directed changes in the content of homocarnosine, putreanine and l-cystathionine in rat brain medulla, cerebellum and hypothalamic area (but not in large hemispheres). Deviations from normal data (in large hemispheres, too) were noted also still in 6 days after the return to the Earth. Effects of stress due to a daily 150 min immobilization within 5 days after the landing in flight rats differed from that in control animals. Some differences between the data relating to flight rats and to animals kept simultaneously in vivarium under all conditions of bio-satellite except the weightlessness have been studied.

ЛИТЕРАТУРА

1. Газенко О. Г., Демин Н. Н., Панов А. Н., Рубинская Н. А., Тигранян Р. А. Космическая биология и авиакосмическая медицина, т. 10, № 4, с. 14—19, 1974.
2. Газенко О. Г., Демин Н. Н., Панов А. Н., Ращевская Д. А., Рубинская Н. А., Тигранян Р. А. Докл. АН СССР, т. 247, № 2, с. 510—512, 1979.
3. Dyomin N. N., Gazenko O. G., Tigranyan R. A. *Physiologist*, v. 23, № 6, Suppl., p. 59—62, 1980.
4. Dyomin N. N., Gazenko O. G., Tigranyan R. A. — In: *Advances in Physiological Science*, v. 19, *Gravitational Physiology* (eds. J. Hildeg. O. Gazenko), p. 79—85 Budapest, Akademiai Kiado, 1981

5. Титаряни Р. А., Ковалев В. Ю. Космическая биология и аэрокосмическая медицина, т. 20, № 3, с. 53—57, 1986.
6. Werman R., Davidoff R. A., Aprison M. H. Life Sci., v. 5, p. 1431—1440, 1966.
7. Adriaenssens K., Allen R. J., Lowenthal A., Mardens Y., Tourtellotte W. W. J. Genet. Hum., v. 17, p. 223—230, 1969.
8. Yoshida S., Masaki S., Teruo A. J. Biochem., v. 79, p. 895—901, 1976.
9. Finkelstein J. D. Metabolism, v. 23, p. 387—398, 1974.
10. Konishi H., Nakajima T., Sano I. J. Biochem., v. 81, p. 200—205, 1977.
11. Asatoor A. M. Biochim. et biophys. acta, v. 586, p. 55—62, 1979.
12. Титаряни Р. А. Метаболические аспекты проблемы стресса в космическом полете, М., Наука, 1985.
13. Kvetnansky R., Mikulaj L. Endocrinology, v. 87, p. 738—743, 1970.
14. Cicero T., Sharpe L., Robins E., Grote S. J. Neurochem., v. 19, p. 2241—2243, 1972.
15. Kanazawa A., Sano I. J. Neurochem., v. 14, p. 211—214, 1967.
16. Kakimoto Y., Nakajima T., Kumon A., Mitsuoka Y., Imaoka N., Sano I. J. Biol. Chem., v. 244, p. 6003—6007, 1969.
17. Shimizu H., Kakimoto Y., Sano I. J. Neurochem., v. 13, p. 65—73, 1966.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
19. Takeuchi H., Mori A., Konsaka M., Ohmori A. Brain Res., v. 67, p. 342—348, 1974.
20. Volpe J. J., Luster L. J. Neurochem., v. 17, p. 425—437, 1970.
21. Титаряни Р. А., Демин Н. Н., Ковалев В. Ю. Нейрохимия, т. 6, № 2, с. 237—243, 1987.
22. Титаряни Р. А., Демин Н. Н., Ковалев В. Ю. Нейрохимия, т. 6, № 3, с. 340—349, 1987.

Поступила 20. II 1988



УДК 577.112:612.822.1

ОБ УЧАСТИИ БЕЛКА S-100 В ФОСФОРИЛОВАНИИ БЕЛКОВ
НУКЛЕОПЛАЗМЫ МОЗГА И ЕГО НАЛИЧИИ В
РИБОНУКЛЕОПРОТЕИДНЫХ ЧАСТИЦАХ

КАПРАЛОВ А. А., ТЮЛЕНЕВ В. И., БЕЛИК Я. В.

Институт биохимии им. А. В. Павлова АН УССР, Киев

В опытах *in vitro* изучено влияние белка S-100 на фосфорилирование белков различных субъядерных фракций. Установлено, что исследуемый белок усиливает фосфорилирование фракции белков, которая экстрагируется из клеточных ядер раствором с 0,14 М NaCl, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ трис (рН 8,0) и содержит рибонуклеопротеидные частицы (РНП-частицы). В наибольшей степени увеличивается фосфорилирование белков с M_r 80 и 150 кД. В присутствии белка S-100 уменьшается фосфорилирование ряда других белковых фракций. Методом иммунодиффузии белок S-100 обнаружен в составе РНП-частиц, выделенных из ядер мозга. Высказывается предположение, что белок S-100 может участвовать в процессах транспорта и процессинга гетерогенной ядерной РНК.

Ранее было показано, что белок S-100 при введении в желудочки мозга способен увеличивать в нем синтез РНК [1]. Добавление этого белка к изолированным клеточным ядрам вызывает увеличение активности РНК-полимеразы [2], что свидетельствует о том, что он может участвовать в синтезе и процессинге РНК в ядрах клеток мозга. В отличие от ранее полученных результатов [3], при использовании метода иммунодиффузии мы не смогли выявить наличие белка S-100 в составе хроматина клеток мозга [4]. В этих экспериментах белок S-100 был обнаружен лишь в составе нуклеоплазмы и ядерной мембраны. Показано также [5], что этот белок не оказывает влияния на фосфорилирование гистонов и щелочерастворимых легистоновых белков, в то время как фосфорилирование ряда других ядерных белков увеличивается в его присутствии. В связи с этим мы предположили, что белок S-100 непосредственно влияет на процессинг и транспорт РНК и лишь косвенно — на ее синтез. Исходя из этого, целью настоящей работы явилось изучение влияния белка S-100 на фосфорилирование белков ядерного сока, включение [³²P] в нуклеиновые кислоты и исследование возможности локализации этого белка в РНП-частицах клеточных ядер мозга.

Материалы и методы

В работе использовали мозг самцов белых крыс массой 150—200 г и серое вещество мозжечка быка. Белок S-100 получали по методу, описанному Stewart [6]. В опытах использовали фракцию IC, которую идентифицировали методами иммунопреципитации и электрофореза. Ядра мозга выделяли по методу, описанному в работе Burdman [7] с некоторыми нашими модификациями. Раствор сахарозы получали на ТКМ-6-ферре (50 мМ трис-HCl, pH 7,5; 25 мМ KCl; 5 мМ MgCl₂). Для получения гомогената ткани использовали 20 объемов 0,32 М сахарозы на одну весовую часть ткани мозга. При центрифугировании концентрацию сахарозы доводили до 1,85—2,0 М. При работе с клеточными ядрами мозга ингибиторы протеаз не использовали, так как протеазной активности в ядрах мозга не было обнаружено [8]. Использование 0,1 мМ фенолметилсульфонилфторида в части опытов не вызывало каких-либо изменений в белковом составе полученных фракций. Ядерные мембраны выделяли в основном по методу, описанному в работе Aquiler, Gleed [9], однако обработку ДНКазой I («Koch-Light», Англия) проводили не в один, а в два этапа: вначале ядра подвергали протеолизу в течение ночи при концентрации фермента 1 мкг/мл и температуре 3°, а затем после 3-х последовательных отмывок с помощью NaHCO₃ в течение 20 мин при концентрации ДНКазы I 20 мкг/мл и температуре 22°. Характеристика полученных мембран ядер мозга описана в предыдущей работе [10]. В реакции фосфорилирования использовали клеточные ядра мозга крыс или фракции ядер мозжечка быка. Фосфорилирование исследовали по ранее описанному методу [5]. При изучении фосфорилирования инкубационная среда содержала 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 25 мМ MgCl₂, 1 мг белка клеточных ядер, 40 мкг белка S-100, 10 мкМ [³²P] АТФ (2,2 · 10⁶ имп/мин в пробе). Время инкубации—10 мин при температуре 37°. Реакцию останавливали добавлением 3 мл раствора, содержащего 0,5 мМ нерадиоактивной АТФ и 3,3 мл 10%-ной ТХУ с 3%-ным пирофосфатом натрия. Осадок промывали на фильтрах Synrog № 8 (ЧССР). Липиды экстрагировали, используя хлороформ-метанол [11]. Нуклеиновые кислоты удаляли обработкой осадка 5%-ной ТХУ при 90° в течение 30 мин. Для определения радиоактивности использовали сцинтилляционную жидкость ЖС-1 и жидкостный сцинтилляционный счетчик SL-30 («Intertechnique», Франция). В некоторых опытах аликвоты полученных фракций использовали для электрофореза, который проводили по Laemmli [12]. В качестве разделяющего был использован 15%-ный ПААГ длиной 15—20 см. После фиксации, окраски Кумасси бриллиантовой голубым G-250 и отмычки гели денситометрировали с помощью микроденситометра «УТ-7609», затем их разрезали на диски шириной 1 мм, сушили в течение 3 ч при температуре 100° и определяли радиоактивность, используя сцинтилляционную жидкость ЖС-1.

При выделении РНП-частиц экстракцию ядер проводили по методу Самаринной и соавт. [13]. В ряде случаев РНП-частицы метили, вводя

крысам по 40 мкКи [^{14}C] оротовой кислоты в желудочки-мозга за 1,5—2 ч до декапитации. Ядерный экстракт центрифугировали в градиенте плотности сахарозы 10—25% в течение 3,5 ч при 27000 об/мин на центрифуге К-32 М. Плавучую плотность частиц определяли с помощью центрифугирования в градиенте CsCl [13, 14]. В этом случае фракции, полученные из градиента сахарозы, анализировали против 1%-ного формальдегида в 0,005 М фосфатном буфере (рН 7,5), смешивали с концентрированным CsCl в 1%-ном формальдегиде, доводя плотность смеси до 1,3 г/см³, и использовали для создания непрерывного преобразованного градиента CsCl . В другое колено смесителя помещали раствор CsCl в 1%-ном формальдегиде с плотностью 1,6 г/см³. Центрифугировали в роторе «SW-39» в течение 18 ч при скорости 150000 г и температуре 4°. Собирали фракции и определяли в них кислотонерастворимую радиоактивность и показатель преломления. Реакцию иммунодиффузии проводили по методу Гусева, Цветкова [15]. В исследованиях использовали специфическую кроличью антисыворотку, полученную к белку S-100 из мозга быка [4].

Результаты и обсуждение

При изучении зависимости процесса включения [^{32}P] в клеточные ядра от содержания добавленного белка S-100 показано, что небольшие его количества (30 мкг/мл) и количества, превышающие физиологическую концентрацию (300 мкг/мл), практически не влияют на этот процесс, а при концентрации белка 60—120 мкг/мл наблюдается увеличение включения метки на 30% (рис. 1). Однако при удалении нуклеиновых кислот из инкубированных ядер обнаружено, что низкие концентрации белка S-100 вызывают увеличение на 50%, а высокие—уменьшение на 20% включения метки в неэкстрагированный остаток ядра, что свидетельствует о связи этого белка с обменом РНК.

Предполагая, что действие белка S-100 может быть опосредовано фосфорилированием белков лишь определенных фракций ядра, изучали влияние этого белка на фосфорилирование эндогенными протеникиназами белков хроматина, ядерных мембран клеток мозжечка быка, а также фракций, экстрагируемых из ядер клеток этой ткани раствором, содержащим 0,14 М NaCl , 1 мМ MgCl_2 , 10 мМ трис- HCl при рН 7,0 и 8,0 (таблица). В этих опытах было обнаружено включение [^{32}P] во все изученные фракции, что согласуется с данными литературы о присутствии эндогенных протеникиназ в составе ядерных мембран [16], нуклеолазмы [17], РНП-частиц [18, 19] и хроматина [20]. Обнаружено (таблица), что фосфорилирование белков, экстрагируемых из ядер раствором, содержащим 0,14 М NaCl , 1 мМ MgCl_2 , 10 мМ трис- HCl , рН 7,0 (фракция рН 7,0), а также белков хроматина не изменяется при добавлении в среду инкубации белка S-100. Эти данные подтверждают ранее полученные результаты [5], свидетельствующие о том, что белок S-100 не влияет на фосфорилирование гистонов и негистоновых белков, экстрагируемых

щелочью. Однако в наших условиях (таблица) наблюдается увеличение фосфорилирования белков фракции, экстрагируемой из ядер раствором, содержащим 0,14 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM трис-HCl, pH 8,0 (фракция pH 8,0), и белков фракции ядерных мембран на 60 и 70% соответственно.

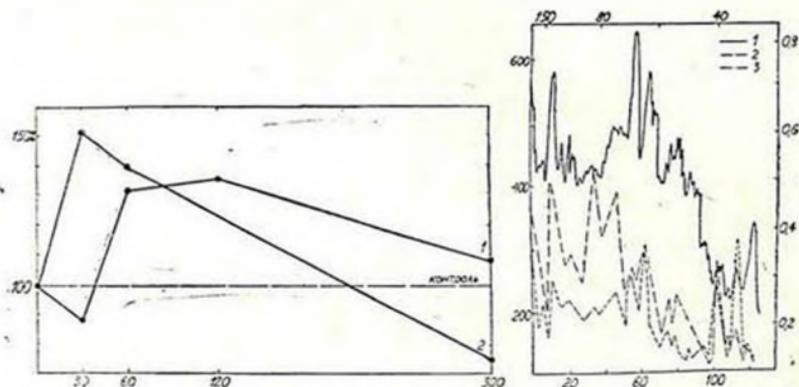


Рис. 1. Влияние белка S-100 на включение [³²P] (в %) изолированными клеточными ядрами мозга крысы: 1—суммарное включение [³²P], 2—включение [³²P] после экстракции нуклеиновых кислот. По оси абсцисс—концентрация белка S-100 (мкг/мл)

Рис. 2. Влияние белка S-100 на фосфорилирование белков, экстрагируемых из ядер 0,14 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM трис, pH 8,0: 1—денситограмма электрофореза белков фракции pH 8,0, 2—фосфорилирование белков фракции pH 8,0 без белка S-100, 3—фосфорилирование белка фракции pH 8,0 в присутствии белка S-100. По оси абсцисс сверху—величина M_r · 10³ Д, снизу—длина геля в мм. По оси ординат слева—включение [³²P] АТР (нмл/мин), справа—A₂₅₀

Для выяснения вопроса о том, какие именно белки фосфорилируются в присутствии белка S-100, нами был проведен электрофорез белков фракции pH 8,0 и фракции ядерных мембран (рис. 2). Денситограмма электрофореза белков фракции pH 8,0 из мозга быка в общем совпадает с денситограммами электрофореза подобных фракций мозга крысы [21, 22]. Некоторые несоответствия, видимо, можно объяснить отличиями исходного материала и методов выделения РНП-частиц. Из рис. 2 видно, что больше всего метки включается в две белковые фракции с M_r около 40 кД и в две фракции с M_r около 70 кД. При изучении фосфорилирования подобной фракции мозга крысы *in vivo* [22] также было обнаружено повышенное включение меченого фосфора в эти белковые фракции. Однако наряду с этим происходит значительное фосфорилирование белков с M_r более 80 кД. В опытах этих авторов [22] также было показано, что фосфопротенды, входящие в состав двух фракций с M_r около 40 кД, являются белками РНП-частиц.

Из данных, приведенных на рис. 2, можно сделать вывод, что при добавлении белка S-100 увеличивается включение метки в белки с M_r 70—150 кД и ~50 кД. Наибольшее включение метки происходит во фракциях с M_r около 150 кД (фракции 14—17) и около 80 кД (фракции 30—50). Нами показано, что в этих условиях уменьшается фосфорилирование одного из белков с M_r 40 кД (рис. 2), который, по данным литературы [21], может входить в состав РНП-частиц. В состав РНП-

Таблица

Влияние белка S-100 на фосфорилирование белков во фракциях, экстрагируемых из ядер мозжечка быка (имп/мин/1 мг белка)

Ядерные фракции	Без белка S-100	В присутствии белка S-100	% к контролю	n	p
Экстрагируемая при pH 7.0	2471±168	2715±240	110	10	>0.5
Экстрагируемая при pH 8.0	3960±1595	6050±878	160	12	<0.05
Мембраны	3020±343	5057±375	170	7	<0.05
Хроматин	3288±358	3511±237	110	12	>0.5

частиц могут входить и некоторые из белков с M_r 80—150 кД [21, 22]. Предположение о влиянии белка S-100 на фосфорилирование белков РНП-частиц подтверждается тем, что этот белок не изменяет суммарного фосфорилирования белков фракции pH 7.0, в которой эти частицы отсутствуют (она содержит в основном белки нуклеоплазмы и ядерных рибосом) [13]. Из рис. 2 видно, что существуют фракции белков, фосфорилирование которых уменьшается в присутствии белка S-100. Вероятно, это можно объяснить влиянием белка S-100 на фосфопротеин-фосфатазу, присутствие которой в препарате РНП-частиц показано в работе Wilks, Knowler [19]. Интересно отметить, что другой Ca^{2+} -связывающий белок—кальмодулин не влияет на фосфорилирование белков в РНП-частицах, а Ca^{2+} незначительно его ингибирует [23]. Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод, что белок S-100 может участвовать в регуляции фосфорилирования белков нуклеоплазмы и ядерных мембран.

Так как среди белков, фосфорилирование которых увеличивается в присутствии белка S-100, могут быть белки РНП-частиц, мы изучили возможность локализации белка S-100 в составе этой ядерной структуры. РНП-частицы, полученные нами из серого вещества мозжечка быка и мозга крысы, были довольно гетерогенны по размеру (рис. 3, 4), что соответствует данным, полученным при изучении РНП-частиц из мозга крысы [24]. Аналогичные результаты получены при выделении РНП-частиц из ткани печени с использованием ингибитора РНКаз [13].

Для устранения возможного загрязнения частиц агрегированными белками ядерного сока в опытах по иммунодиффузии в качестве РНП-частиц использовали фракции с коэффициентом седиментации более 80S. Плавающая плотность исследованных препаратов частиц при центрифуги-

ровании в CsCl составляла 1,40 г/см³. Методом иммунодиффузии белок S-100 был обнаружен нами как во фракции, имеющей коэффициент седиментации меньше 80S, так и во фракции с большим коэффициентом седиментации, а также в осадке. Для устранения возможных загрязнений фракции РНП-частиц ее собирали и повторно центрифугировали. И в этом случае в их составе был обнаружен белок S-100. Для лучшей диссоциации частиц опыты по иммунодиффузии проводили с добавлением к ним 1%-ного ДДС-Na.

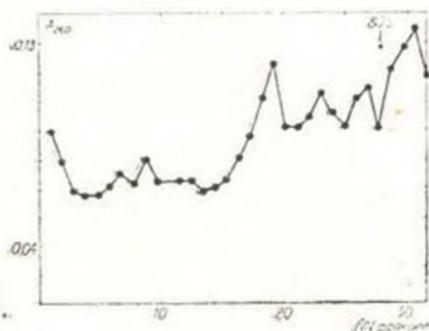


Рис. 3. Седиментационное распределение рибонуклеопротеидных частиц, выделенных из ядер мозга быка

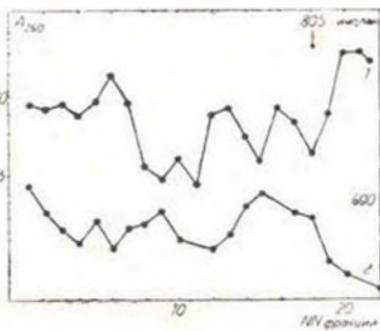


Рис. 4. Седиментационное распределение рибонуклеопротеидных частиц, выделенных из ядер мозга крысы: 1—поглощение при 260 нм, 2—радиоактивность

Таким образом, входя в состав РНП-частиц и оказывая влияние на фосфорилирование белков нуклеоплазмы и мембран, белок S-100 может принимать участие в процессинге гетерогенной ядерной РНК. Ранее нами было показано [25], что этот белок влияет на транспорт РНК из изолированных ядер мозга, то есть полученные данные подтверждают наше предположение о том, что белок S-100 может иметь значение в регуляции процесса передачи генетической информации на посттранскрипционном уровне. В то же время этот белок, видимо, может участвовать и в транскрипции, влияя на хроматин опосредованно.

ON THE PARTICIPATION OF S-100 PROTEIN IN PHOSPHORYLATION OF BRAIN NUCLEOPLASM PROTEINS AND ITS PRESENCE IN RIBONUCLEOPROTEIN

KAPRALOV A. A., TYULENEV V. I., BELIK Ya. V.

A. V. Palladin Institute of Biochemistry, Ukrainian SSR Acad. Sci., Kiev

The effect of S-100 protein on phosphorylation of various sub-nuclear fractions proteins has been studied at the experiments in vitro. The protein mentioned has been established to increase the phosphory-

lation of protein fraction extracted from cell nuclei with the solution containing 0,14 M NaCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM tris (pH 8,0). This fraction contained RNP-particles. The most phosphorylated fractions were those with M_r of about 80 and 150 kD. In the presence of S-100 protein phosphorylation of a number of other protein fractions were decreased. S-100 protein was detected in ribonucleoprotein particles by means of immunodiffusion assay. S-100 protein has been suggested to participate in the processes of transport and processing of heterogeneous nuclear RNA.

ЛИТЕРАТУРА

1. Полстаев А. Б., Миани Н., Мичетти Ф., Донато Р. Биохимия, т. 48, 1820—1824; 1983.
2. Miani N., Michetti F., De Renzi G., Caniglia A. *Experientia*, v. 29, p. 1499—1501, 1973.
3. Michetti F., Miani N., De Renzi G., Caniglia A., Correr S. *J. Neurochem.*, v. 22, p. 239—244, 1974.
4. Капралов А. А., Смирчинская Л. С., Белик Я. В., Тюленев В. И. *Нейрохимия*, т. 2, с. 26—33, 1983.
5. Тюленев В. И., Капралов А. А., Смирчинская Л. С., Белик Я. В. *Биохимия*, т. 48, с. 827—831, 1983.
6. Stewart J. *Biochem. et biophys. acta*, v. 263, № 1, p. 188—192, 1972.
7. Burdman J. A. *J. Neurochem.*, v. 19, p. 1459—1469, 1972.
8. Selwood S., Riches P. G., Harrap K. R., Rick-Wood D., Mac Gilltway A. J. *J. Biochem.*, v. 52, p. 551—566, 1975.
9. Aqutter P. S., Gleed Ch. D. *Biochem. J.*, v. 192, № 1, p. 185—189, 1980.
10. Капралов А. А., Тюленев В. И., Назаренко В. И. *Нейрохимия*, т. 5, с. 219—220, 1986.
11. Folch J. Z., Lees N., Stanley C. N. *S. J. Biol. Chem.*, v. 26, p. 497—509, 1957.
12. Laemmli U. K. *Nature*, v. 227, № 5259, p. 680—685, 1970.
13. Самарина О. П., Луканидин Е. М., Георгиев Г. П. *Молекуляр. биол.*, т. 2, № 1, с. 79—87, 1968.
14. Овчинников А. П., Вороница А. С., Степанов А. С.—В кн.: *Методы современной биохимии*, с. 42—44, М., Наука, 1975.
15. Гусев А. А., Цостков В. С. *Лаб. дело*, № 2, с. 43—45, 1961.
16. Smith Ch. D., Wells W. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 9360—9367, 1983.
17. Reddy A. V., De Langet P. J. *Int. J. Biochem.*, v. 17, № 6, p. 477—482, 1982.
18. Blanchard J. M. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* v. 97, p. 524—529, 1980.
19. Wilks A. F., Knowler J. F. *Biochim. et biophys. acta*, v. 652, № 1, p. 228—233, 1981.
20. Kitzis A., Tichonicky L., Defer N., Krueh J. *Eur. J. Biochem.*, v. 111, № 1, p. 237—244, 1980.
21. Matringe H., Jacob M. *Biochimie*, v. 54, p. 1169—1179, 1972.
22. Gallinaro-Matringe H., Jacob M. *FEBS Lett.*, v. 36, № 1, p. 105—109, 1974.
23. Periasamy M., Brunel C., Jeanteur Ph. *Biochimie*, v. 61, p. 823—826, 1979.
24. Gallinaro-Matringe H., Stevenin J., Jacob M. *Differentiation*, v. 9, № 3, p. 147—155, 1977.
25. Капралов А. А., Тюленев В. И. *Докл. АН УССР, сер. Б*, № 4, с. 62—64, 1985.

Получено 12. V 1988.



УДК 577.151.042+577.152.1.+577.175.32

ПЕПТИДИЛГЛИЦИН α -АМИДИРУЮЩАЯ
МОНООКСИГЕНАЗА ИЗ ГРАНУЛ АДЕНОГИПОФИЗА:
ОЧИСТКА И СВОЙСТВА

ШАРОЯН С. Г., АБРАМЯН К. С., НАЛБАНДЯН Р. М.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Из секреторных гранул передней доли гипофиза быка получен в электрофоретически гомогенном виде фермент, амидирующий синтетический трипептид dl-Ala-Gly-Gly. Величина M_r фермента по данным гель-фильтрации через сефадекс G-100 и электрофореза в 10%-ном ПААГ с ДДС-Na равна 60 ± 3 кД. Выход белка составляет примерно 1 мг на 100 г сырой ткани аденогипофиза. Оптимум pH находится в области 7,0—7,4. Показано, что фермент является медьсодержащей монооксигеназой. Установлено, что низкие концентрации ионов двухвалентной меди стимулируют активность фермента, а высокие приводят к его ингибированию.

Bradbury и соавт. [1] впервые обнаружили в нейросекреторных гранулах гипофиза свиньи фермент с $M_r \approx 60$ кД, способный превращать пептид-предшественник гормона (-X-Gly) в пептид-амид (-X-NH₂), являющийся активной формой пептидного гормона. В качестве субстрата в этих исследованиях был использован синтетический трипептид D-Tyr-Val-Gly, имеющий структурное сходство с карбоксильным концом предполагаемого предшественника α -меланоцитстимулирующего гормона. Для изучения специфичности действия этого фермента были использованы синтетические трипептиды [2, 3] с измененной аминокислотой в положениях 2 и 3. В результате этих исследований было установлено, что фермент строго специфичен по отношению к C-концевой аминокислоте, которая должна представлять собой глицин. В работах другой группы авторов исследовались свойства частично очищенного амидирующего фермента из разных отделов гипофиза крысы и быка [4—6]. Было обнаружено, что активность фермента полностью подавляется хелаторами двухвалентных металлов. Авторы далее показали, что из 10 различных ионов двухвалентных металлов только Ca^{2+} полностью восстанавливает активность фермента. Таким образом, был сделан вывод, что амидирующий фермент является медьзависимым. Как оказалось, для работы фермента необходим молекулярный кислород, следовательно, амидирующий фермент представляет собой оксидоредуктазу. Из нескольких исследо-

ванных кофакторов наивысшая активность проявлялась — в присутствии аскорбиновой кислоты. Исходя из этих данных, было предложено называть этот фермент пептидилглицин α -амидирующей монооксигеназой (ПАМ).

В последние годы аналогичная ферментативная активность была обнаружена во многих эндокринных тканях, а также жидкостях животных и человека (гипофиз, гипоталамус, щитовидная железа, плазма крови, СМЖ, нижнечелюстные железы, предсердие, окологлазные железы) [7—10]. В большинстве из этих работ амидирующую активность измеряли либо в грубых гомогенатах ткани, либо в частично очищенном препарате фермента. Во всех случаях было показано, что активность стимулируется Cu^{2+} , аскорбатом и требует наличия кислорода.

В настоящее время известны лишь два исследования, в которых фермент удалось получить в гомогенном состоянии. В одном из них Mizuno и соавт. [11] выделили очищенный фермент с M_r 39 кД из секрета кожи лягушки, в другом Murthy и соавт. [12] удалось получить из средней доли гипофиза быка две формы фермента: ПАМ-А и ПАМ-В. Как выяснилось, ПАМ-В при электрофорезе в 10%-ном ПААГ дает одну полосу, соответствующую M_r 37 кД, тогда как основная полоса ПАМ-А соответствует 48 кД, однако препарат содержал также минорные примеси. ПАМ-А обнаруживает кислые свойства, адсорбируясь на ДЭАЭ-ц и элюируется с нее 0,1 М NaCl, тогда как ПАМ-В не адсорбируется на ней. В связи с изложенным представлялось интересным выделить и изучить свойства амидирующего фермента из гранул, полученных из других долей гипофиза, и в частности из передней доли (аденогипофиза).

Материалы и методы

Получение секреторных гранул аденогипофиза и их лизис. Гранулы получали как из свежей, так и из замороженной при -70° ткани аденогипофиза крупного рогатого скота. Все процедуры осуществляли при 4° . Передние доли гипофиза очищали от пленки и соседних тканей и промывали раствором 0,3 М сахарозы, содержащим 0,01 М Na^+ , K^+ -фосфатный буфер, pH 6,2. Отмытую от крови ткань (100—200 г) гомогенизировали в том же буферном растворе из расчета ткань/буфер, равном 1/5 (вес/объем) в течение 30 с в гомогенизаторе РТ-1 при скорости 8000 об/мин. Гомогенизацию продолжали в гомогенизаторе Поттера-Эльвехейма со свободно пригнаным тефлоновым пестиком. Гомогенат центрифугировали при 1000 g 8 мин. Осадок еще дважды обрабатывали аналогичным образом в гомогенизаторе Поттера-Эльвехейма и центрифугировали 5 мин при 1000 g для удаления ядер и неразрушенных клеток. Объединенные надосадочные растворы фильтровали через двойной слой марли и центрифугировали 50 мин при 6000 g. Осадок суспендировали в исходном буферном растворе из расчета 1 мл на 1 г исходной ткани и наслаивали на градиент сахарозы со слоями 1,6 и 1,3 М. Центрифугирование проводили на горизонтальном роторе VAC-602 1 ч при 80000 g. Субклеточные частицы, оказавшиеся в 1,6 М слое и в осадке, представ-

ляют собой секреторные гранулы. Как показал электронномикроскопический анализ, гранулы, полученные описанным способом из свежей ткани, полностью сохраняют нативную структуру и практически свободны от примеси других субклеточных органелл (рис. 1, а). Они, однако, гетерогенны по размерам и плотности. В случае замороженной ткани гранулы также нативны, однако в полученной фракции содержатся примеси митохондрий и других частиц, составляющие не более 10%. Гранулы хранили в 30—40%-ной сахарозе при -30° . При таком способе хранения большинство гранул (90%) сохраняется в нативном виде даже при длительности хранения несколько месяцев. Выход влажной пасты гранул составляет примерно 10% от веса сырой очищенной ткани аденогипофиза.

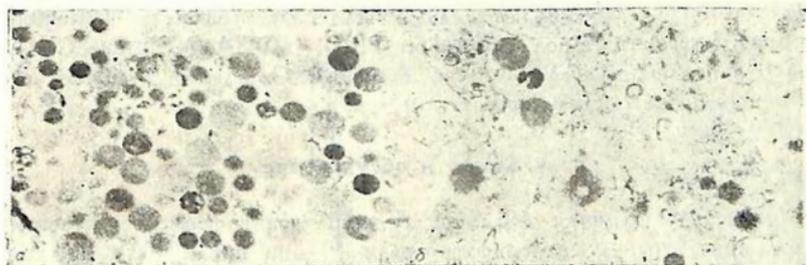


Рис. 1. Электронномикроскопические снимки гранул аденогипофиза быка (увеличение 32000 X): а—нативные гранулы, б—замороженные гранулы.

Лизис гранул осуществляли многократным замораживанием в жидком азоте и последующим размораживанием суспензии гранул в 0,1 М глицин—NaOH буфере, pH 9,0. Как видно из рис. 1, б, эта процедура приводит к разрушению более 80% гранул.

Определение активности ПАМ. Разработали методику определения активности ПАМ, используя о-фталальдегид (о-ФДА) в качестве флуоресцентной метки. Как известно, о-ФДА в присутствии 2-меркаптоэтанола образует с первичными аминами флуорофоры. Метод позволяет определять аминокислоты, пептиды и белки в пиколярном диапазоне [13]. В качестве субстрата использовали синтетический трипептид dl-Ala-Gly-Gly («Reanal», Венгрия). Для определения активности фермент инкубировали с субстратом в 0,1 М фосфатном буфере, pH 7,0 при 26° 3 ч. Объем инкубационной среды составлял 0,52 мл. Конечные концентрации компонентов в инкубационной смеси составляли: субстрата—200 мкг/мл, фермента—10 мкг/мл, ионов меди—0—10 мкмоль. К 50 мкл аликвотам добавляли 200 мкл 0,015%-ного раствора о-ФДА в 0,1 М боратном буфере, pH 9,7, содержащем 10^{-3} М 2-меркаптоэтанола. Пробы инкубировали 9 мин при комнатной температуре, затем добавляли 3 мл воды и сразу регистрировали флуоресценцию смеси в относительных единицах при $\lambda_{\text{возб.}} = 344$ нм, $\lambda_{\text{эм.}} = 450$ нм. Скорость ферментативной реакции определяли как количество мкмоль образовавшегося флуоресцирующего продукта на мкг белка в течение 1 ч.

Аналитические методы и реактивы. Флуориметрические измерения проводили на спектрофлуориметре MPF-44 A («Perkin—Elmer», США) в односантиметровой кювете при комнатной температуре. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре модели 26 («Beckman», Австрия) также в односантиметровых кюветах. Содержание белка определяли по поглощению при 278 нм и по методу Lowry и соавт. [14]. Величину M_r белков оценивали гель-фильтрацией через сефадекс G-100 и электрофорезом в 10%-ном ПААГ по методу Weber, Osborn [15]. Медь определяли химическим путем, используя тетраэтилтиурам дисульфид в качестве хелирующего реагента [16]. Величину коэффициента экстинкции окрашенного комплекса меди с реагентом при 420 нм принимали равной $37400 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. Были использованы сефадексы G-100 и SP-сефадекс С-50 («Pharmacia», Швеция), реактивы для электрофореза («Reanal», Венгрия), 2-меркаптоэтанол («Fergak», ФРГ), о-ФДА («Sigma», США), ДЭАЭ-52 целлюлоза («Whatman», Англия). Остальные реактивы отечественного производства марок х. ч. и ч. д. а.

Результаты и обсуждение

Получение и очистка фермента. Для получения фермента суспензию лизированных гранул центрифугировали 40 мин при 26000 г, полученный осадок гранул вновь суспендировали в 0,1 М глицин-NaOH буфере, рН 9,0, гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера-Эльвехейма с жестко пригнанным пестиком и центрифугировали при тех же условиях. Для полной белковой экстракции описанную обработку гранул проводили 7—8 раз. Надосадочные растворы объединяли и доводили рН до 6,5 добавлением 0,2 М уксусной кислоты. Образовавшийся осадок удаляли центрифугированием, а экстракт после диализа против 0,01 М фосфатного буфера, рН 6,6, концентрировали на колонке с ДЭАЭ-ц, уравновешенной тем же буфером. Колонку промывали исходным буфером и белковые фракции элюировали 0,1 М фосфатным буфером, содержащим 0,4 М NaCl. Полученный элюат подвергали гель-фильтрации через сефадекс G-100, уравновешенный 0,01 М фосфатным буфером, рН 6,6, содержащим 0,1 М NaCl. На рис. 2 представлена типичная элюионная диаграмма, получаемая на этой стадии очистки. Амидирующей активностью обладает только фракция 2 (отмечена черточками). Определение меди в пробах выявило наличие его во фракциях 1,2 и 4. Для дальнейшей очистки фермента фракцию 2 концентрировали на колонке с ДЭАЭ-ц, уравновешенной 0,01 М фосфатным буфером, рН 6,6. Колонку промывали 100 мл порциями 0,01 М, 0,02 М и 0,03 М буфера и собирали фракцию, элюирующуюся 0,1 М буфером, содержащим 0,4 М NaCl. Элюат вновь пропускали через сефадекс G-100 (сверхтонкий). Основной белковый пик, полученный на этой стадии, соответствует M_r 60 кД и обладает амидирующей активностью. Для последующей очистки фермента рН раствора снижали до 4,0 добавлением 0,2 М уксусной кислоты и наносили на небольшую колонку с SP-сефадексом, С-50, уравнове-

шенную 0,01 М ацетатным буфером, рН 4,1. При этих условиях хроматографии ПАМ не адсорбируется на колонке. Элюирующуюся без задержки фракцию концентрировали на небольшой колонке с ДЭАЭ-ц. Полученный таким образом белок является гомогенным при электрофорезе в 7%-ном ПААГ. Инкубирование препарата в смеси 1% ДДС-На—5 М мочевины—1%-ный 2-меркаптоэтанол приводит к появлению одной полосы при электрофорезе в ПААГ с ДДС-На, которая соответствует $M_r 60 \pm 3$ кД (рис. 3). Данные гель-фильтрации также приводят к величине $M_r 60$ кД. По описанной процедуре удается получить около 1 мг электрофоретически гомогенного фермента из 100 г сырой ткани аденогипофиза (или 10 г пасты гранул). Использованный метод очистки позволяет получить препарат ПАМ, имеющий величину У. А. порядка 10 мкмоль/мкг белка/ч, что в 50000 раз выше, чем у исходного гомогената.

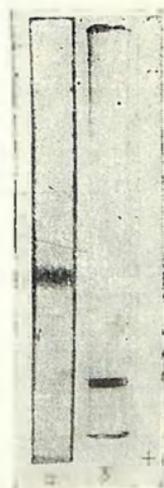
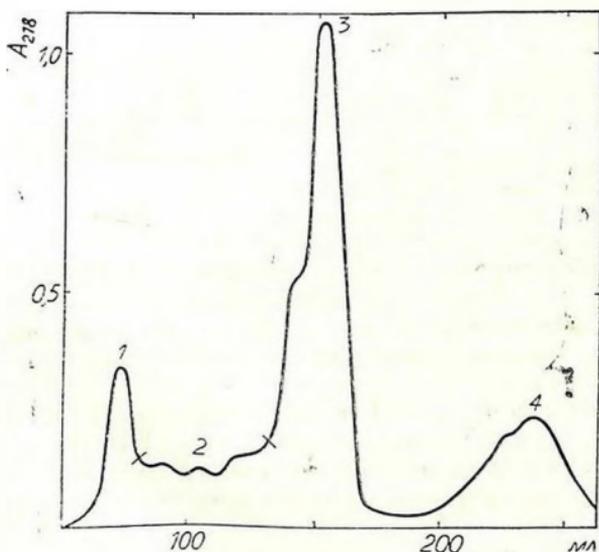


Рис. 2. Элюиционная диаграмма, полученная при гель-фильтрации экстракта гранул через сефадекс G-100. Размер колонки 3×37 см

Рис. 3. Электрофоретические диаграммы очищенного фермента (анод внизу): а—нативный препарат в 7%-ном ПААГ, б—электрофорез выполнен в 10%-ном ПААГ, содержащем 0,1% ДДС-На после предобработки фермента в диссоциирующих условиях. Количество нанесенного белка равно 40 мкг

Свойства ПАМ. Результаты электрофореза свидетельствуют о том, что фермент состоит из одной полипептидной цепи. Определение меди в препарате белка показало, что ПАМ из аденогипофиза является медьсодержащим ферментом: на молекулу массой 60 кД приходится один атом меди.

Нами было исследовано влияние рН, ионной силы и ионов меди на активность ПАМ. На рис. 4 приведены данные о влиянии рН и ионной

силы на активность фермента: рН-оптимум оказался в диапазоне 7,0—7,4; активность фермента резко падает при рН 6,0. Из рисунка видно, что активность ПАМ также зависит от ионной силы среды. Полученная зависимость имеет колоколообразный вид с максимумом при 0,1 М. В присутствии 0,5 М NaCl активность фермента падает примерно в 20 раз по сравнению с 0,1 М буфером.

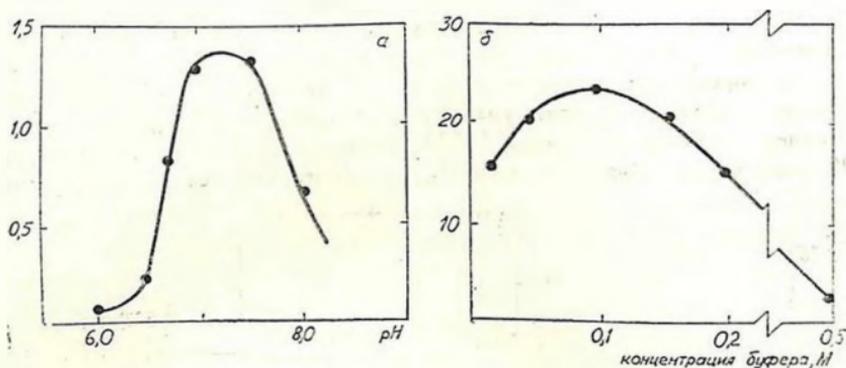


Рис. 4. Зависимость активности фермента: а—от рН, б—от ионной силы среды. Активность выражена в усл. ед.

При исследовании влияния ионов меди обнаружилось, что при концентрации Cu^{2+} , равной 1—3 мкмоль, фермент активируется в 2—3 раза, однако более высокие концентрации Cu^{2+} приводили к его ингибированию. Так, 10 мкмоль Cu^{2+} уменьшают скорость ферментативной реакции в 6—7 раз.

Хранение фермента при 4° в 0,1 М фосфатном буфере, рН 7,4, содержащем 0,4 М NaCl, практически не сказывалось на его активности в течение трех недель. Однако даже однократное замораживание препарата в этом же буфере с последующим размораживанием приводит к полной потере активности ПАМ.

Как было отмечено выше, в экстракте секреторных гранул аденогипофиза содержатся, по крайней мере, три медьсодержащие фракции. Одним из медьсодержащих компонентов сравнительно низкомолекулярной фракции 4 (рис. 2) оказался нейрокупреин—кислый медьсодержащий белок с M_r около 9 кД, обнаруженный нами ранее в больших полушариях головного мозга крупного рогатого скота [17]. Очистка и более подробное изучение других медьсодержащих компонентов фракций 1 и 4, возможное регуляторное воздействие их на активность амидирующего фермента является предметом нашего дальнейшего исследования.

В последние годы в литературе обсуждается вопрос о роли амидирующего фермента в передней доле гипофиза, ибо, в отличие от средней и задней долей, где большинство известных гормонов амидированы с карбоксильного конца, идентифицированные гормоны передней доли не амидированы с С-конца [18]. В этой связи представляют интерес данные

Murthy и соавт. [12] о соотношении ПАМ активности в трех долях гипофиза быка. Согласно их данным, активность фермента в передней доле в 8 раз меньше, чем в средней и задней долях. Противоположные данные получены в работе Eipper и соавт. [4], где наибольшая амидирующая активность отмечалась именно в аденогипофизе крысы. Таким образом, полученные в настоящей работе данные являются прямым экспериментальным подтверждением недавнего предположения [18] о том, что в аденогипофизе существуют еще не идентифицированные амидированные на С-конце биологически активные пептиды, для синтеза которых и требуется амидирующий фермент. Очистка и изучение свойств этих амидированных пептидов может приоткрыть новые регуляторные механизмы, находящиеся под контролем аденогипофиза.

PEPTIDYLGLYCINE α -AMIDATING MONOOXYGENASE FROM GRANULES OF THE ANTERIOR PITUITARY: PURIFICATION AND PROPERTIES

SHAROYAN S. G., ABRAMYAN K. S., NALBANDYAN R. M.
Institute of Biochemistry, Arm. SSR Acad. Sci., Yerevan

The enzyme which amidates synthetic peptide dl-Ala-Gly-Gly was purified as electrophoretically homogeneous preparation from secretory granules of the anterior lobe of bovine pituitary. The yield of the enzyme was 1 mg per 100 g of wet weight of the anterior lobe. According to the gel-filtration and polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulphate M_r of the enzyme was found to be of 60 ± 3 kD. Effects of pH, ionic strength and freezing-thawing on the activity of the enzyme were studied. The enzyme is considered to be the copper-containing monooxygenase. Cu^{2+} at low concentrations stimulates the enzyme activity, whereas at high ones it leads to inhibition.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bradbury A., Finnie M., Smyth D. *Nature*, v. 298, p. 686—688, 1982.
2. Bradbury A., Smyth D. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 112, p. 372—377, 1983.
3. Landymore-Lim A., Bradbury A., Smyth D. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 117, p. 289—293, 1983.
4. Eipper B., Mains R., Glembotski Ch. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, v. 80, p. 5144—5148, 1983.
5. Mains R., Glembotski Ch., Eipper B. *Endocrinology*, v. 114, p. 1522—1530, 1984.
6. Glembotski Ch., Eipper B., Mains R. *J. Biol. Chem.*, v. 259, p. 6385—6392, 1984.
7. Eipper B., Myers A., Mains R. *Endocrinology*, v. 116, p. 2497—2504, 1985.
8. Baylin S., Eipper B., Mains R. *Metab. Clin. Exp.*, v. 34, p. 1044—1052, 1985.
9. Wang G., Ney R., Mains R., Eipper B. *Neuroendocrinology*, v. 41, p. 482—489, 1985.

10. *Sakata Y., Mizuno K., Matsuo H.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 140, p. 230-236, 1986.
11. *Mizuno K., Sakata Y., Kojima M., Kangawa K., Matsuo H.* Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 137, p. 984-991, 1986.
12. *Murthy A., Mains R., Eipper B.* J. Biol. Chem., v. 261, p. 1815-1822, 1986.
13. *Benson Y., Hare P.* Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 72, p. 619-622, 1975.
14. *Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R.* J. Biol. Chem., v. 193, p. 265-275, 1951.
15. *Weber K., Osborn M.* J. Biol. Chem., v. 244, p. 4406-4412, 1969.
16. *Matsuba Y., Takahashi Y.* Anal. Biochem., v. 36, p. 182-191, 1970.
17. *Sharoyan S., Shaljian H., Nalbandyan R., Buniatian H.* Biochim. et biophys. acta, v. 493, p. 478-487, 1977.
18. *Glenbootski Ch.* Arch. Biochem. and Biophys., v. 241, p. 673-683, 1985.

Поступила 14. III 1988



УДК 547.963.3.611+616.127—005.8 : 036

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ФОСФОЛИПИДНЫЙ СОСТАВ ХРОМАТИНА ГОЛОВНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ОДНОСТОРОННЕЙ ГАНГЛИОСИМПАТЭКТОМИИ

КАРАГЕЗЯН К. Г., ОВЕЯН Г. А., ДЕМИН Ю. М., ОВСЕПЯН Л. М.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван
*Ереванский государственный медицинский институт

На фоне односторонней ганглиосимпатэктомии (удаление правого верхнего шейного симпатического узла) были изучены флуоресцентные характеристики и фосфолипидный состав хроматина. Впервые при односторонней ганглиосимпатэктомии показаны изменения в физико-химических свойствах хроматина, в качественном и количественном составе связанных с ним фосфолипидов и жирных кислот, входящих в состав этих соединений.

Показано, что фосфолипиды принимают активное участие в функциональной регуляции генетического аппарата клетки, контролируемой со стороны симпатической НС.

Установлено, что ганглиосимпатэктомия сопровождается значительными: качественными и количественными сдвигами гистонов, негистоновых белков, нуклеиновых кислот клеток головного мозга, что, естественно, может привести к расстройствам структурной организации и функциональной активности хроматина [1].

Целью настоящего исследования явилось изучение на фоне ганглиосимпатэктомии физико-химических свойств хроматина с использованием данных по изучению флуоресцентных показателей, сдвигов качественного и количественного состава фосфолипидов и их жирнокислотного спектра.

Материалы и методы

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 проведенной операции судили по развивающемуся синдрому Клода-Бернара-Горнера (четко выраженный анюфтальм, сужение глазной щели и зрачка). Животных декапитировали под легким эфирным наркозом через 7 суток после экстирпации узла. Ядра выделяли по методу Dingman, Sporn [2] и очищали. Из последних получали хроматин

по методу Shaw, Huang [3] и изучали его флуоресценцию в 0,001 М трис-НСl буфере, рН 8,0 в концентрации 25 и 50 мкг/мл в прямоугольных кварцевых кюветах 1×1 см при комнатной температуре на флуоресцентном спектрофотометре MPF-2A («Hitachi», Япония) при максимальной чувствительности прибора и ширине щелей монохроматоров 6—10 ммк. Экстракцию фосфолипидов (ФЛ) из хроматина проводили по методу 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 проводили с помощью фирменных, химически чистых свидетелей («Sigma», США). Минерализацию липидного фосфора проводили в среде серной и азотной кислот с последующим пересчетом в мкг на 1 мг свежего хроматина [6]. Метилвые эфиры жирных кислот ФЛ получали по методу Штоффеля [6]. Состав высших жирных кислот ФЛ хроматина определяли методом ГЖХ на хроматографе «Хром-5» (ЧССР) с пламенноионизационным детектором. В качестве жидкой фазы использовали полиэтиленгликольсукцинат, твердой—хромосорб. Газ-носитель гелий. Температура испарителя, колонки и детектора соответственно 210, 180 и 210°. Идентификацию метиловых эфиров жирных кислот проводили путем сравнения с хроматограммой смеси насыщенных и ненасыщенных метиловых эфиров жирных кислот с длиной углеродной цепи C₁₄₋₂₂.

Результаты и обсуждение

Полученные результаты продемонстрировали относительное повышение при ганглиосимпатэктомии интенсивности флуоресценции хроматина в обоих полушариях мозга (рис. 1), сопровождающееся подавлением квантового выхода и некоторым сдвигом спектров возбуждения (287 нм в правом, со стороны эктомированного шейного ганглия и 288 нм в левом, интактном полушариих против 292 нм контроля) и эмиссии (325 нм в правом и 328 нм в левом полушариих против 330 нм контроля) в коротковолновую область. При диссоциации же хроматина 2 М раствором NaCl происходит относительное повышение интенсивности флуоресценции контрольного хроматина по сравнению с хроматином эктомированной и интактной сторон и увеличение квантового выхода. При этом отмечается также сдвиг спектров возбуждения и эмиссии в коротковолновую область (289 нм против 292 нм и 325 нм против 330 нм соответственно) без выхода, однако, за пределы, характерные для триптофанильных остатков [7]. Вместе с этим с эктомированной стороны констатируется смещение спектра эмиссии хроматина в длинноволновую область (328 нм против 325 нм), что свидетельствует об изменении полярности микроокружения вокруг триптофанилов белков хроматина [8]. Примечательно, что наличие положительной заряженности служит причиной перемещения спектра излучения в коротковолновую область. Таким образом, становится очевидным, что эффект десимпатизации сопровож-

дается изменениями в хроматине, носящими разнонаправленный характер, в связи с чем было предпринято также изучение и флуоресценций катионного красителя АО (акридин оранж), адсорбированного на хроматине. Исследования показали, что для комплексов АО+хроматин характерны незначительный коротковолновый сдвиг спектров флуоресценции, возрастание интенсивности и длительности флуоресценции краси-

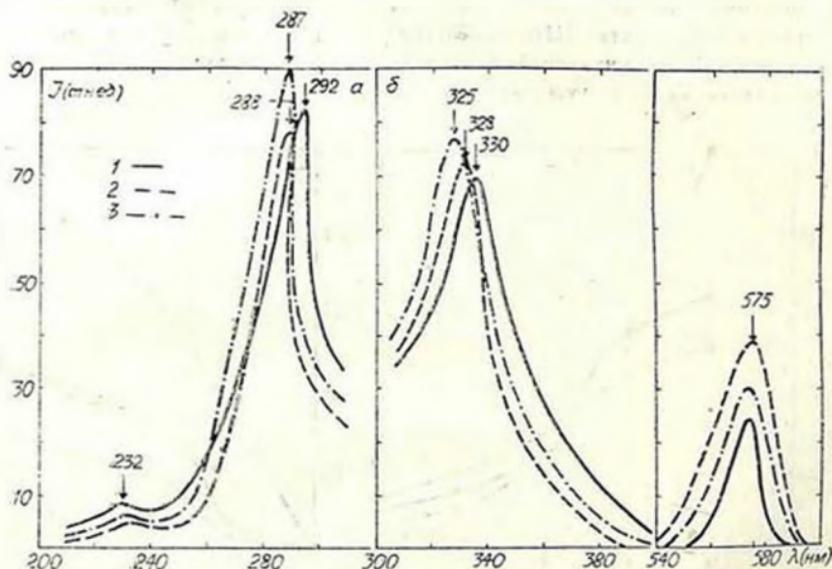


Рис. 1. Спектры экстинкции (а) при $E_{in} W-330$ нм и эмиссии (б) при $E_{ex} W-292$ нм хроматина, полученного из больших полушарий мозга белых крыс: 1—контроль (неоперированные животные), 2—левое интактное полушарие, 3—правое эктомированное полушарие. Ширина щелей монохроматоров экстинкции и эмиссии—7 нм. Хроматин разбавлен в 20 раз в $\times 10^{-3}$ М трис-НСI буфере, рН 8.0.

теля, имеющие более выраженное проявление в хроматине интактного полушария и в хроматине обеих полушарий контрольных животных. Эти данные свидетельствуют о доступности меньшей части ДНК хроматина эктомированной стороны к взаимодействию с красителем [9]. Были изучены и некоторые особенности взаимодействия Ca^{2+} с хроматином. При добавлении раствора $CaCl_2$ в конечной концентрации $3 \cdot 10^{-2}$ М при 575 нм наблюдается резкое возрастание интенсивности флуоресценции и светорассеяния, что фактически является проявлением феномена рассеяния возбуждающего света Релея и Тиндаля второго порядка [10]. Эти закономерности оказались наиболее демонстративными в отношении хроматина мозговой ткани с ганглиоэктомированной стороны. Последующее добавление $CaCl_2$ сопровождается развитием эффекта тушения флуоресценции. Как видно из рис. 2, с увеличением концентрации Ca^{2+} параметры флуоресценции, отражающие структурное состояние белков хро-

матрия мозговой ткани контрольных животных и в какой-то степени интактного полушария десимпатизированных животных, претерпевают скачкообразные сдвиги. Последнее свидетельствует о кооперативном характере переходов, происходящих в белках, демонстрирующих весьма высокую степень чувствительности к конформационному состоянию белковой макромолекулы [8]. Этого нельзя сказать в отношении хроматина ганглиозктомированной стороны, резко отличающегося и эффективностью тушения в координатах Штерна-Фольмера [11] от контрольного хроматина, полученного из интактной половины головного мозга, демонстрирующего сходную картину тушения (рис. 3).

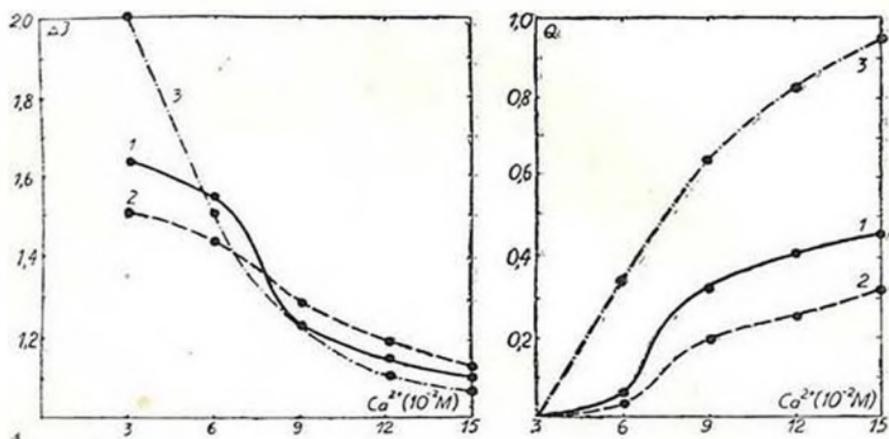


Рис. 2. Зависимость параметра ΔJ , характеризующего относительную интенсивность флуоресценции от концентрации CaCl_2 хроматина, полученного из больших полушарий мозга белых крыс. Обозначения те же, что на рис. 1
Рис. 3. Зависимость эффективности тушения (Q) в координатах Штерна-Фольмера от концентрации CaCl_2 хроматина, полученного из больших полушарий мозга белых крыс. Обозначения те же, что на рис. 1

Таким образом, при односторонней ганглиосимпатэктомии констатируются принципиально новые и значительные по существу отклонения в физико-химических свойствах хроматина, наиболее резко проявляющиеся в полушарии мозга со стороны десимпатизации. Об этом, в частности, свидетельствуют и результаты проведенных нами исследований по изучению инфракрасных спектров хроматина [12].

Учитывая имеющиеся сведения относительно изменений количества и состава гистонов, негистоновых белков, нуклеиновых кислот, разыгрывающихся и в интактной половине головного мозга при ганглиосимпатэктомии, можно прийти к заключению о разнонаправленности изменений, совершающихся во взаимодействиях между ДНК и белками хроматина. При этом существенна также роль липидного окружения, обеспечиваемого преимущественно за счет фосфолипидов, принимающих, по всей ве-

Таблица 1

Состав фосфолипидов хроматина головного мозга белых крыс при
односторонней ганглиосимпатэктомии
(абсолютные количества, $M \pm m$ и % от суммы фосфолипидов)

Фосфолипиды	Контрольный хроматин		Хроматин правого полушарья			Хроматин левого полушарья		
	мкг ФЛ на 1мг хроматина	% от суммы	мкг ФЛ на 1мг хроматина	% от суммы	% отклонение от контроля	мкг ФЛ на 1мг хроматина	% от суммы	% отклонение от контроля
Фосфатидилолины	$4,579 \pm 0,107$	40,5	$3,296 \pm 0,025^*$	40,3	<28,0	$3,464 \pm 0,011^*$	40,0	<24,3
Фосфатидилэтанолламины	$2,031 \pm 0,050$	18,0	$1,383 \pm 0,038^*$	16,9	<31,9	$1,226 \pm 0,033^*$	14,1	<39,6
Сфингомиелины	$1,457 \pm 0,036$	12,8	$0,933 \pm 0,011^*$	11,4	<40,0	$1,020 \pm 0,013^*$	11,8	<30
Монофосфоэзитид фосфатиды	$1,432 \pm 0,031$	12,7	$0,891 \pm 0,039^*$	10,9	<37,8	$0,928 \pm 0,013^*$	10,7	<35,2
Фосфатидилсерин	$0,909 \pm 0,018$	8,0	$0,816 \pm 0,015$	10,0	<10,2	$1,076 \pm 0,027^{**}$	12,4	>18,4
Кардиолинин, фосфатидная кислота	$0,901 \pm 0,032$	8,0	$0,856 \pm 0,021$	10,5	<5,0	$0,954 \pm 0,017$	11,0	>5,9
Общее количество	$11,309 \pm 0,130$	100	$8,175 \pm 0,088^*$	100	<27,7	$8,669 \pm 0,054^*$	100	<23,3
Коэффициент нейтральности ФЛ-ис-ые ФЛ	2,48		2,26		<8,9	1,93		<22,2

Примечание. * $p < 0,001$, ** $p < 0,02$

роятности, немаловажное участие в качестве одного из существенных компонентов генетического аппарата. Нами были изучены изменения в качественном и количественном составе фосфолипидов хроматина при односторонней ганглиосимпатэктомии. Как видно из табл. 1, последняя сопровождается снижением общего содержания фосфолипидов хроматина как в правом (на 27%), так и в левом (интактном) полушариях мозга. Эти результаты свидетельствуют о возможном снижении матричной активности хроматина путем изменения степени гидрофобных взаимодействий между ДНК и гистонами, а также влиянием на конформацию белков и белок-белковые взаимодействия, уменьшая доступность РНК-полимераз к промоторной области гена [13]. В реализации отмеченных сдвигов важное значение имеет, по-видимому, уменьшение относительного количества сфингомиелина и фосфатидилинозита (табл. 1).

Таблица 2

Жирнокислотный состав фосфолипидов хроматина головного мозга белых крыс при односторонней ганглиосимпатэктомии (% от суммы жирных кислот)

Жирные кислоты	ЖК ФЛ контрольного хроматина	ЖК ФЛ хроматина правого полушария	ЖК ФЛ хроматина левого полушария
C _{14:0}	1,01±0,04	1,02±0,04	1,58±0,05*
C _{15:0}	0,69±0,04	0,74±0,06	1,31±0,02*
C _{16:0}	20,37±0,22	32,06±0,52*	26,64±0,67*
C _{16:1}	4,83±0,29	3,79±0,16****	7,02±0,61****
C _{17:0}	2,86±0,17	3,08±0,20	4,58±0,22**
C _{18:0}	29,08±0,38	27,26±0,25***	19,48±0,76*
C _{18:1}	26,87±0,39	24,07±0,49**	23,51±0,31**
C _{18:2}	6,28±0,41	4,12±0,31**	5,58±0,27
C _{20:3}	4,95±0,48	1,12±0,11*	3,46±0,134****
C _{20:4}	3,07±0,16	2,75±0,06****	6,87±0,25*
Насыщенные	54,01±0,43	64,15±0,35*	53,58±0,09
Моноеновые	31,70±0,47	27,86±0,55**	30,42±0,34****
Полиеновые	14,29±0,74	7,95±0,36*	16,03±0,31****

Примечание. ЖК ФЛ—жирнокислотный состав фосфолипидов: * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,02$; **** $0,05 > p > 0,02$.

Однако матричная активность хроматина зависит не только от спектра и количественного содержания отдельных фракций, но и от жирнокислотного состава фосфолипидов хроматина [13, 14]. Поэтому нами было предпринято специальное изучение жирнокислотного состава фосфолипидов хроматина при односторонней ганглиосимпатэктомии и, как вытекает из данных табл. 2, наблюдающиеся изменения носят разносторонний характер. Так, например, увеличение уровня насыщенных жирных кислот совершается, в основном, за счет C₁₆₋₀, а уменьшение количества полиеновых жирных кислот фосфолипидов хроматина в эктомированном полушарии свидетельствует о подавлении РНК-полимеразной ак-

тивности [15]. Этого нельзя сказать в отношении хроматина интактного полушария мозга: здесь, наоборот, имеет место увеличение содержания полиеновых жирных кислот при почти неизменном уровне насыщенных с одновременным уменьшением количества $C_{18:0}$ по сравнению с контролем. Этот факт мы склонны объяснить компенсаторным характером описанных изменений в хроматине интактного полушария, что и находит свое подтверждение в картине разносторонних изменений физико-химических свойств хроматина при односторонней ганглиосимпатэтомии.

FLUORESCENT AND PHOSPHOLIPID ANALYSIS OF RAT BRAIN CHROMATINE AFTER THE UNILATERAL GANGLIOSYMPATHECTOMY

KARAGEOZIAN K. G., HOVEYAN G. A., DYOMIN Yu. M.,
HOVSEPIAN L. M.

Institute of Experimental Biology, Arm. Acad. Sci. and Yerevan
State Medical Institute, Yerevan

The fluorescent characteristics and phospholipid composition of chromatine were studied under the conditions of unilateral gangliosympathectomy (removal of high cervical right sympathetic ganglion).

Alterations in physico-chemical properties of chromatine after the unilateral gangliosympathectomy have been first demonstrated, as well as the quantitative and qualitative changes in the phospholipids and fatty acids associated with it. Thus, the data obtained lead us to the conclusion that phospholipids play an important role in functional regulation of cell genetic apparatus controlled by sympathetic nervous system.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочарян К. М. Канд. дисс., Ереван, 1981.
2. Dingman C. W., Sporn M. B. J. Biol. Chem., v. 239, p. 3483-3488, 1964.
3. Shaw L. M. J., Huang R. C. Biol. Chem., v. 9, p. 4530-4536, 1970.
4. Folch J. J. Biol. Chem., v. 145, p. 35-40, 1942.
5. Карагеомян К. Г.—В кн.: Фосфолипиды и их роль в жизнедеятельности организма, с. 267, Ереван, 1972.
6. Методы биохимических исследований, (под ред. М. И. Прохоровой). Ленинград, ЛГУ, 1982.
7. Давтян М. А., Каварян Р. Р., Асмян Ю. М. Биол. журн. Армении, т. 31, № 7, 714-719, 1978.
8. Черницкий Е. А.—В кн.: Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке, с. 277, Минск, Наука и техника, 1972.
9. Борисова О. Ф., Суравая А. Н. Молекуляр. биология, т. 1, с. 141-195, Итоги науки и техники, 1973.
10. Юленфред С.—В кн.: Флуоресцентный анализ в биологии и медицине, с. 484, М., Мир, 1965.
11. Бурштейн Э. А. Биофизика, т. 7, с. 187, Итоги науки и техники, 1977.

12. Овсян Г. А., Кочарян К. М., Саакян Л. А. V Всесоюзн. биохимический съезд, т. 2, с. 364, Киев, Наука, 1986.
13. 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.
14. Бурлакова Е. Б., Джалбава М. И., Гвахария В. О., Глуценко Н. Н., Молочкина Е. М., Штолько В. Н.—В кн.: Биоантиокислители в регуляции метаболизма в норме и патологии. Труды МОИП, т. 57, с. 113—140, М., Наука, 1982.
15. Бабенко Н. А. Украинский биохим. журнал, т. 58, № 3, с. 40—47, 1985.

Поступила 25. III 1989



УДК 577.150.3

ИНТЕНСИВНОСТЬ ПЕНТОЗНОГО ЦИКЛА В МОЗГУ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СОСТОЯНИЯХ ЦНС И ДЕЙСТВИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

ХАЧАТРЯН Г. С., КАЗАРЯН А. Р., АДАМЯН М. Х.,
АКОПЯН А. А., АНТОНЯН А. А.
Филiaal ВНИИГИНТОКСа, Ереван

Изучена активность ключевых ферментов и содержание важных метаболитов пентозного цикла при различных функциональных состояниях ЦНС и действия биологически активных веществ из группы природных соединений. Показано повышение активности глюкозо-6-фосфат-, 6-фосфоглюконатдегидрогеназ, транскетолазы при возбуждении и понижение их активности при торможении ЦНС. Экзогенно введенные аденозин, сАМР и уридин односторонне вызывают понижение активности ферментов пентозного цикла и аналогичны эффекту при торможении ЦНС. Действия гуаноина, сGMP и цитидина противоположны эффекту адениловых соединений и уридина, сходны с эффектом при возбуждении ЦНС и вызывают значительное повышение активности дегидрогеназ, транскетолазы и содержания глюкозо-6-фосфата, 6-фосфоглюконата и рибулозо-5-фосфата в мозгу. Рассмотрен возможный механизм участия пуриновых и пиримидиновых циклических нуклеотидов и нуклеозидов в индукции и подавлении активности ферментов пентозного цикла в норме и патологии. Испытанные препараты могут быть использованы для их целенаправленного и локального воздействия на интенсивность пентозного цикла в мозгу при различных патологических и экстремальных состояниях.

Пентозофосфатному пути метаболизма глюкозы в мозгу и других тканях посвящены многочисленные исследования [1—7]. В последнее десятилетие изучается интенсивность пентозного цикла в мозгу при патологии ЦНС, и в частности при психических заболеваниях [8, 9], различных интоксикациях [10]. Поражение ЦНС нередко сопровождается изменением интенсивности пентозофосфатного пути в мозгу, что может привести к нарушению снабжения важных структур нервной ткани восстановительными эквивалентами в продукции энергии и липогенезе, а также фосфорилированными сахарами в биосинтезе пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, соответственно и нуклеиновых кислот и белков нервной ткани. В поисках биохимических агентов, способных целенаправленно воздействовать на интенсивность пентозного цикла в мозгу, изучали активность ключевых ферментов и уровней метаболитов пентозного цикла в мозгу при различных функциональных состояниях ЦНС и действия биологически активных веществ из группы природных соединений.

Материалы и методы

Опыты ставили на белых крысах-самцах массой 130—150 г. Функциональное состояние ЦНС вырабатывали условнорефлекторным методом [1]. В ряде серий экспериментов животным внутримышечно вводили нуклеозиды и циклические нуклеотиды (аденозин, гуанозин, цитидин, уридин, сАМР, сGMP) в концентрации 0,08—0,16 мкмоль/150 г массы животного. В нужный момент функциональной активности ЦНС и через 30 мин после внутримышечного введения биологически активных веществ экспериментальных животных подвергали замораживанию в жидком азоте. Последующие операции проводили в холодной комнате (при 2°). Головной мозг отделяли и использовали для выделения и определения активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы, транскетолазы и количества углеводно-фосфорных соединений (глюкозо-6-фосфат, 6-фосфоглюконат, рибулозо-5-фосфат).

Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу из мозга крыс выделяли по методу Bessel, Thomas [11].

Выделение и определение активности 6-фосфоглюконатдегидрогеназы проводили по методу, описанному Pontremoli, Grazi [12], в нашей модификации применительно к мозговой ткани.

Транскетолазу выделяли по методу Novello, McLean [13], а активность фермента определяли, используя метод Dishe [14].

Содержание глюкозо-6-фосфата определяли по прописи Gailonde и Evans [15], а 6-фосфоглюконата по методу Mollering, Bergmeyer [16].

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены данные об изменении активности ключевых ферментов пентозного цикла в мозгу при возбуждении и торможении ЦНС. Как показывают приведенные данные, активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, 6-фосфоглюконатдегидрогеназы и транскетолазы достоверно повышается при пищевом и условнорефлекторном пищевом возбуждении. При этом активность двух окислительных ферментов увеличивается почти вдвое. Катализируемая глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой реакция протекает по механизму присоединения субстратов, при котором присоединение NADP^+ предшествует глюкозо-6-фосфату, а отщепление 6-фосфоглюконата от фермент-субстратного комплекса— $\text{NADPH} + \text{H}^+$ [17]. Полагают, что оксидоредуктазы вообще и дегидрогеназы пентозного цикла, в частности, относятся к группе ферментных белков, мало изменившихся в эволюционном отношении, что придает им высокую степень функциональной мобильности у различных представителей животного мира.

Активность изучаемых нами ферментов в мозгу претерпевает значительные изменения и при условнорефлекторном торможении, но в противоположном направлении. При этом активность обеих дегидрогеназ понижается почти в 2 раза, а транскетолазы в пределах достоверности. Подобная изменчивость активности указанных ферментов и их функ-

циональная оперативность при воздействиях физиологических факторов, биологически активных соединений и продуктов метаболизма, по-видимому, объясняется индукцией или репрессией определенных изоферментов [3] и потребностью в больших количествах восстановительных эквивалентов и фосфорных эфиров различных углеводов для биоэнергетического и биосинтетического обеспечения клеток головного мозга. Если доказано большое разнообразие изоферментного состава дегидрогеназ пентозного цикла, то следения о гетерогенности транскетолазы и других ферментов пентозного цикла ограничены.

Таблица 1

Активность ферментов пентозного цикла в мозгу крыс при различных функциональных состояниях ЦНС, ед/мг белка

Название ферментов	Контроль	Пищевое ислабуждение	Условно-пищевое возбуждение	Условно-пищевое торможение
Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа	0,99±0,02 (12)	1,84±0,04*** (12)	1,31±0,06** (12)	0,55±0,02*** (12)
6-фосфоглюконатдегидрогеназа	0,62±0,02 (12)	1,21±0,06*** (12)	1,11±0,04** (12)	0,35±0,03*** (12)
Транскетолаза	1003,25±19,98 (16)	1855,30±13,16*** (12)	1760,12±17,25** (12)	725,90±0,88** (12)

Примечание. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Учитывая, что функциональные состояния ЦНС базируются на рецепторных перестройках, транзиттерной мобилизации и внутриклеточной медиации сигналов информации, в которых участвуют многие биологически активные вещества, в том числе нейрогомоны, циклические нуклеотиды и другие физиологически активные вещества [18], мы изучали действие нуклеозидов и циклических нуклеотидов на активность ферментов пентозного цикла. Как показывают данные табл. 2, пуриновые нуклеозиды аденозин и гуанозин в концентрации 0,08 и 0,16 мкмоль/150 г массы животного вызвали разнонаправленные изменения в активности изученных нами ферментов. Аденозин достоверно понижал активность глюкозо-6-фосфат- и 6-фосфоглюконатдегидрогеназ и транскетолазы. Активность последнего фермента понижалась более чем в 2 раза. Гуанозин, наоборот, достоверно повышал активность глюкозо-6-фосфат и 6-фосфоглюконатдегидрогеназ. При этом активность транскетолазы повышалась в 2 раза. Противоположные изменения в активности изученных нами ферментов в мозгу были выявлены и при действии пиримидиновых нуклеозидов—цитидина и уридина в той же концентрации. При этом цитидин значительно повышал, а уридин, наоборот, понижал активность дегидрогеназ пентозного цикла. Активность транскетолазы при действии цитидина повышалась более чем в два раза. Уридин в пределах достоверности понижал активность указанного фермента.

Анализ полученных данных показывает, что пуриновые и пиримидиновые нуклеозиды могут разнонаправленно регулировать активность раз-

Таблица 2

Активность ферментов пентозного цикла в мозгу при действии
пуриновых и пиримидиновых нуклеозидов, ед/мл белка

Название фермента	Контроль	Аденозин, мкмоль		Гуанозин, мкмоль		Цитидин, мкмоль		Уридин, мкмоль	
		0,08	0,16	0,08	0,16	0,08	0,16	0,08	0,16
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа	0,82 ±0,02 (16)	0,65* ±0,02 (12)	0,58** ±0,04 (12)	1,24*** ±0,01 (12)	1,26*** ±0,04 (12)	1,42*** ±0,04 (12)	1,52*** ±0,06 (12)	0,56*** ±0,04 (12)	0,48*** ±0,02 (12)
6-фосфоглюконад-дегидрогеназа	0,57 ±0,01 (16)	0,45* ±0,02 (12)	0,42** ±0,02 (12)	0,83** ±0,01 (12)	0,96*** ±0,06 (12)	0,99*** ±0,02 (12)	1,16*** ±0,04 (12)	0,39*** ±0,02 (12)	0,34*** ±0,02 (12)
Транскетолаза	1125,5 ±34,2 (16)	732,4** ±9,2 (12)	464,0*** ±7,2 (12)	2227,0*** ±74,4 (12)	2286,0*** ±82,5 (12)	2405,0*** ±89,4 (12)	2492,0*** ±90,2 (12)	1055,71*** ±22,3 (12)	845,0** ±24,1 (12)

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

личных ферментов. Гуанозин и цитидин выступают в качестве индукторов активности ключевых ферментов пентозного цикла, в то время как аденозин и уридин, наоборот, выступают в качестве ингибиторов активности указанных ферментов. Природа данного явления все еще остается неизвестной. Зависят ли установленные эффекты аденозина и уридина, с одной стороны, и гуанозина и цитидина—с другой, в подавлении и усилении интенсивности пентозного цикла от структуры самих соединений? Считать ли их действие специфическим или же они реализуют свои эффекты опосредованно через другие механизмы? Для выяснения выдвинутых нами сложных вопросов мы изучили действие сАМР и сGMP, содержащих соответственно аденозин и гуанозин, а также фосфодиэфирную конфигурацию, на активность ферментов пентозного цикла. Данные табл. 3 показывают, что 3',5'-АМР и 3',5'-GMP в концентрации 0,08 мкмоль/150 г массы животного вызывают противоположные изменения в активности ферментов. 3',5'-АМР достоверно понижает актив-

Таблица 3

Активность ферментов пентозного цикла в мозгу крыс при действии циклических нуклеотидов, ед/мг белка

Название ферментов	Контроль	сАМР, 0,03 мкмоль	сGMP, 0,08 мкмоль
Глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназа	0,86±0,04 (16)	0,71±0,02 (8)	0,36±0,02*** (8)
6-фосфоглюконат-дегидрогеназа	0,59±0,01 (16)	0,49±0,02 (8)	0,98±0,12** (8)
Транскетолаза	1085,0±36,2 (16)	835,24±8,42** (8)	2286,40±64,25*** (8)

Примечание. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

ность глюкозо-6-фосфат-, 6-фосфоглюконатдегидрогеназ и транскетолазы, в то время как 3',5'-GMP более чем в два раза повышает активность транскетолазы и достоверно активность обеих дегидрогеназ. Эти эксперименты показали сходство в действии аденозина с сАМР, с одной стороны, гуанозина и сGMP—с другой, на активность ключевых ферментов пентозофосфатного пути. Ранее нами [19] была показана идентичность действия аденозина и 3',5'-АМР, с одной стороны, гуанозина и 3',5'-GMP—с другой, на содержание серотонина и катехоламинов в мозгу. Аденозин и 3',5'-АМР повышали содержание катехоламинов и уменьшали количество серотонина, в то время как гуанозин и 3',5'-GMP, наоборот, увеличивали содержание серотонина и уменьшали количество катехоламинов. Биохимические эффекты циклических нуклеотидов при их введении в организм исследовались недостаточно из-за плохой их проницаемости. Эффект увеличения активности глюкозо-6-фосфат-, 6-фосфоглюконатдегидрогеназ и транскетолазы при внутрицистернальном введении гуанозина, сGMP и цитидина аналогичен эффекту, установленному при возбуждении, в то время как эффект действия сАМР, аденозина и уридина аналогичен эффекту торможения. Природу указанных явлений в ЦНС трудно свести лишь к индивидуальным особенностям каждого из применяемых веществ. Помимо фосфодиэфирной конфигурации цик-

лических нуклеотидов, в реализации их эффекта важную роль может играть структура азотистых оснований нуклеотидов и нуклеозидов и рецепторной ориентации указанных соединений. Возможно, что введенные нуклеозиды и циклические нуклеотиды непосредственно или через соответствующие рецепторы включаются в механизм высвобождения нейротрансмиттеров. По всей вероятности, регуляторные механизмы в центральных структурах будут также различаться в силу наличия множества рецепторов, контактируемых участков нейрональных узлов передачи информации, больших возможностей взаимодействия и конкуренции между различными трансмиссерами за сравнительно общие и специфические рецепторы положительной и отрицательной обратной связи. Обмен катехоламинов и серотонина в центральных синапсах тесно связан с содержанием внутриклеточных нуклеотидов, нуклеозидов и других активных веществ. Аденозин [20], а также катехоламины и серотонин могут активировать циклазные реакции, направленные на биосинтез соответствующих нуклеотидов, обеспечивающих реакции фосфорилирования ферментов в пути биосинтеза аминов, в катаболизме и анаболизме углеводов, липидов и других веществ. Открыт ингибитор, который по типу обратной связи может подавлять стимулирующее действие катехоламинов на содержание 3',5'-АМР и 3',5'-GMP [21]. Повышение концентрации 3',5'-АМР под влиянием адреналина стимулирует накопление ингибитора обратной связи, который, в свою очередь, стимулирует накопление 3',5'-GMP. В настоящее время установлено самостоятельное функционирование, по крайней мере, трех аденилатциклаз, специфических к аденозину, дофамину и Ca^{2+} . Известно, что кроме инсулина и АХ к числу нейрогормональных факторов, реализующих свои эффекты через cGMP, можно отнести и серотонин, ряд стероидных гормонов, простагландинов, АКТГ и др. На основании полученных нами ранних и настоящих данных можно полагать, что в реализации действия введенных 3',5'-АМР и 3',5'-GMP не исключено также действие аденозина и гуанозина, направленное на рецепторное индуцирование образования 3',5'-АМР и 3',5'-GMP в нервных клетках. В результате этого наступает реципрокное изменение уровней норадреналина и дофамина, с одной стороны, и серотонина и других нейротрансмиттеров — с другой, которые посредством циклических нуклеотидов индуцируют протеинкиназы, фосфорилирующие различные белки, в том числе и ферменты пентозного цикла [19]. Контроль активности дегидрогеназ гексозомонофосфатного шунта в мозгу будет зависеть от соотношения NADP^+ и $\text{NADPH} + \text{H}^+$. $\text{NADPH} + \text{H}^+$ и глюкозо-6-фосфат вызывают диссоциацию глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на субъединицы, а NADP^+ , наоборот, стабилизирует активную форму фермента [22]. Гормональные воздействия, и, возможно, применяемые нами биологически активные вещества изменяют изоферментный спектр дегидрогеназ пентозного цикла [23] и тем самым контролируют его. Являясь липидзависимым ферментом [3], активность глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы может контролироваться также жирными кислотами и их производными. За счет подавления активности фермента, по-видимому, возрастает клеточный фонд глюкозо-6-фосфата и снижается скорость его утилизации в пентозном

Таблица 4

Содержание фосфорных эфиров углеводов в мозгу при действии биологически активных веществ, мкмоль/г ткани

Название	Контроль	Аденозин	cAMP	Гуанозин	cGMP	Цитидин	Уридин
Глюкозо-6-фосфат	0,120 ±0,004 (12)	0,120 ±0,009 (10)	0,130 ±0,007 (8)	0,67*** ±0,05 (10)	0,65*** ±0,04 (8)	0,99*** ±0,06 (10)	0,135 ±0,007 (10)
6-фосфоглюкозат	0,036 ±0,005 (12)	0,027 ±0,009 (10)	0,038 ±0,007 (8)	0,167*** ±0,005 (10)	0,162*** ±0,004 (8)	0,247*** ±0,012 (10)	0,038 ±0,007 (10)
Рибулозо-5-фосфат	0,012 ±0,002 (12)	0,0076 ±0,0002 (10)	0,0084 ±0,0003 (8)	0,0180** ±0,0006 (10)	0,0190** ±0,0004 (8)	0,0220*** ±0,0002 (10)	0,0110 ±0,0003 (10)

Примечание. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

цикле. При физиологических состояниях гликолитический и пентозофосфатный пути в организме сопряжены. Изофермент II транскетозалы бывает в свободном виде и может формировать комплекс с трансальдозазой, в то время как изофермент I находится в комплексе с глицеральдегидфосфатдегидрогеназой [24] и ответствен за переключение пентозного цикла на гликолиз. Регулятором скорости пентозного цикла может выступить и эритрозо-4-фосфат [25].

Стимулирующее действие гуанозина, cGMP и цитидина на активность ферментов пентозного цикла, установленное нами, возможно, зависит не только от их непосредственного воздействия на активность изученных нами ферментов, но и от участия этих веществ в активировании механизмов образования фосфорных эфиров углеводов на предшествующих этапах их образования. Как показывают данные табл. 4, содержание глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата при действии гуанозина и cGMP возрастает в 5 раз, а цитидина соответственно в 8 и 7 раз. При этом достоверно увеличивается и содержание рибулозо-5-фосфата. В противоположность этому, при действии аденозина, cAMP и уридина содержание глюкозо-6-фосфата и 6-фосфоглюконата особым изменениям не подвергается, колеблясь в пределах контрольных опытов. Количество рибулозо-5-фосфата имеет тенденцию к незначительному уменьшению. Понижение активности изученных нами ферментов при торможении мозговой деятельности и действии аденозина, cAMP и уридина, возможно, зависит от недостаточного фосфорилирования глюкозы и подавления путей образования глюкозо-6-фосфата. В результате недостаточного образования фермент-субстратного комплекса ключевого фермента глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы претерпевают изменения и активности двух последующих ферментов. Подавляющий эффект аденозина и cAMP на интенсивность пентозного цикла объясняется еще и тем, что по принципу дуалистического контроля регуляции [18] они могут способствовать понижению концентрации веществ, усиливающих активность ключевых ферментов пентозного цикла—гуанозина и cGMP. Повышение концентрации последних в нервных клетках, в свою очередь, может вызвать понижение содержания аденозина и cAMP и аннулировать их подавляющий эффект. Интенсивность пентозного цикла в мозгу важна и при стрессе оксидативной формы, наступающем при усилении липидной пероксидации, имеющей место при болезни Альцгеймера [8] и других видах церебральной дегенерации. Усиленная продукция $NADPH+H^+$ необходима не только для биосинтетических реакций, но и для восстановления глутатиона, являющегося субстратом глутатионпероксидазы, катализирующей восстановление перекисей при их обезвреживании. Перекись водорода устраняется также дисмутацией в супероксидный радикал, обезвреживаемый супероксиддисмутазой [9]. Целенаправленное увеличение активности дегидрогеназ и других ферментов пентозного цикла с помощью экзогенно введенных внутриклеточных регуляторов и индукторов из группы природных соединений имеет большое локальное значение в увеличении $NADPH+H^+$ для глутатионзависимой пероксиддетоксицирующей системы: при различных нервных заболеваниях.

THE INTENSITY OF PENTOSE CYCLE IN BRAIN UNDER VARIOUS FUNCTIONAL CONDITIONS OF CNS AND UNDER THE ACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES

KHACHATRIAN G. S., KAZARIAN A. R., ADAMIAN M. Ch., AKOPIAN A. A., ANTONIAN A. A.

Affiliate of VNIIGNTOX, Yerevan

The activities of key enzymes and the content of significant metabolites of pentose cycle during various functional conditions of CNS and under the action of biologically active substances from the natural compounds group was studied. An increase in the activity of glucose-6-phosphate-6-phosphogluconate dehydrogenases and transketolase during the stimulation and decrease of their activities during the CNS inhibition was shown. Exogenously injected adenosine, cAMP and uridine undirectly decreased the activity of the pentose cycle enzymes and it was analogous to that detected after CNS inhibition. The effects of guanosine, cCMP and cytidine were opposite to those of adenylic compounds and uridine, and are similar to the effect observed at CNS stimulation which has brought to the significant increase of dehydrogenase and transketolase activity as well as to the increase of the contents of glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate and ribulose-5-phosphate in brain. A possible mechanism of purine and pyrimidine cyclic nucleotides and nucleosides participation in the induction and suppression of activities of pentose cycle enzymes in the norm and pathology was considered. The tested preparations can be used for the purposeful and local regulation of the intensity of pentose cycle in brain at various pathologica- and extremal conditions.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Хачатрян Г. С. Биохимия головного мозга. Гексозомонофосфатный шунт в мозгу. Ереван, Айтастан, 1967.
2. Hostetler K. Y., Landau B. R., White R. J., Albin M. S., Yashon D. J. Neurochem., v. 17, p. 33—39, 1970.
3. Кудрявцева Г. В. Успехи соврем. биол., т. 89, в. 1, с. 74—89, 1980.
4. Hotherstall J. S., Greenbaum A. L., McLean P. J. Neurochem., v. 39(5), p. 1325—1332, 1982.
5. Острооский Ю. М., Горбач Э. В., Мазлыш С. С., Кубышин В. А. Докл. АН БССР, т. 27, № 4, с. 375—377, 1983.
6. Gallonde M. K., Evison E., Evans G. M. J. Neurochem., v. 41, p. 1253—1260, 1983.
7. Weiss K. S., Schofield P. J., Edwards M. R. J. Neurochem., v. 44, p. 510—517, 1985.
8. Martins R. W., Harper G. G., Stokes G. B., Masters C. L. J. Neurochem., v. 46, № 4, p. 1042—1045, 1986.
9. Marklund S. L., Adolfsson R., Gottfries C. J., Winblad B. J. Neurol. Sci., v. 67, p. 319—325, 1985.
10. Hallstedt B., Gutteridge M. C. Trends Neurosci., v. 8, p. 22—26, 1985.
11. Bessel E. M., Thomas P. Biochem. J., v. 131, p. 83—89, 1973.

12. *Pontremoli S., Grazi E.* *Methods in Enzymol.*, v. 9, p. 137—141. N.-Y., Acad. Press., 1966.
13. *Novello F., McLenn P.* *Biochem. J.*, v. 107, № 6, p. 775—791, 1968.
14. *Dische Z.* *J. Biol. Chem.*, v. 204, № 2, p. 983—987, 1953.
15. *Gailondo M. K., Evans G. M.* *Neurochem. Res.*, v. 7, p. 1163—1179, 1982.
16. *Mollering H., Bergmeyer H. U.* D-gluconate, in *Methods of Enzymatic Analysis*, (ed. Bergmeyer H. U.), v. 3, p. 1243—1247, 1978.
17. *Kunji M. I., Toews M. L., Carper W. R.* *J. Biol. Chem.*, v. 251, p. 2258, 1976.
18. Хачатрян Г. С. Биохимия нуклеиновых кислот и высшие функции головного мозга. Ереван, Айтастан, 1981.
19. Хачатрян Г. С., Бакунц Г. Г. *Биол. журн. Армении*, т. 37, № 1, с. 5—11, 1984.
20. *Daval J. L., Barbertis C. C.* *r. Acad. sci. D—290*, v. 8, p. 597—600, 1980.
21. *Asakawa T., Ruiz J.* *Ho Ren-Jyl. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci.*, v. 75, № 6, p. 2684—2688, 1978.
22. *Yue R., Noltmann E., Kuby S.* *J. Biol. Chem.*, v. 244, p. 1353, 1969.
23. Колодилова А. И.—В сб.: Пентозофосфатный путь, его химизм и регуляция. с. 15. ЛГУ, 1977.
24. Кочетов Г. А. Структура и функция транскетолазы. Автореферат докт. дисс., М., 1978.
25. Свєрчин С. Е., Степанова Н. Г. *Биохимия*, т. 38, № 3, с. 583, 1973.

Поступила 14. IV 1988



УДК 577.12:616-831-005.4-73.584-092.9

ДИНАМИКА УРОВНЕЙ МАКРОЭРГИЧЕСКИХ ФОСФАТОВ МОЗГА ВО ВРЕМЯ ИШЕМИИ ПО ДАННЫМ [³¹P]ЯМР СПЕКТРОСКОПИИ

ЛИХОДИИ С. Ст., *ЛИХОДИИ Ст. С., СИБЕЛЬДИНА Л. А., СЕМЕНОВА Н. А.

Институт химической физики АН СССР, Москва;
*Государственный медицинский институт, Целиноград

Для приближенной регистрации методом [³¹P]ЯМР фосфорсодержащих метаболитов мозга крысы разработан датчик с поверхностной катушкой, отличающийся высокой пространственной избирательностью и чувствительностью, что позволило существенно сократить время на получение [³¹P]ЯМР спектра мозга крысы *in vivo* (до 30—60с) и исследовать тем самым динамику быстротекающих энергетических процессов в ткани мозга.

Исучена динамика изменений фосфорных метаболитов мозга крыс в течение 30 мин полкой ишемии. Зарегистрировано быстрое снижение макроэргических фосфатов мозга, рост уровня P_i и фосфомоноэфиров с одновременным развитием внутриклеточного ацидоза. Установлен бифазный характер снижения уровней креатинфосфата и АТФ. Обсуждены возможные механизмы выявленных особенностей изменения уровней макроэргов.

Нарушение энергетического метаболизма является важным процессом ишемии головного мозга, которое определяет развитие патологических механизмов клеточного повреждения, связанных с нарушением ионотранспортных функций, деградацией мембранных фосфолипидов, активацией свободнорадикальных процессов [1, 2].

Несмотря на многочисленные исследования, посвященные влиянию ишемии на уровни макроэргических фосфатов мозга, основанные на использовании физико-химических методов, в том числе ЯМР спектроскопии [3—5], в литературе приводятся часто плохо согласующиеся друг с другом показатели энергетического метаболизма и данные о темпах изменений уровней макроэргов в динамике ишемии.

Так, по данным Wimp и соавт. [3], в мозгу крыс уже в первые 60 с ишемии на 60% снижается уровень АТФ и на 97% падает содержание креатинфосфата (КР). Kaasik и соавт. [4] в те же сроки обнаружили снижение содержания АТФ и КР соответственно на 15 и 50%, а в исследованиях Тельпухова и соавт. [5] падение АТФ на 45% зарегистрировано лишь на 10-ой мин ишемии. Отличаются и другие показате-

ли биоэнергетики мозга, в том числе интактных животных. Коор и соавт. [6] в мозгу крыс отношение K/P_1 нашли равным $3,1 \pm 0,3$ (экстракты), в работе Lill и соавт. [7] оно оказалось равным $5,3 \pm 2,8$ (данные *in vivo*), а в опытах Jackson и соавт. [8] этот показатель достигал значений $5,09 \pm 1,0$.

Таким образом, как для ишемической, так и для интактной ткани мозга в литературе приводятся показатели биоэнергетики, отражающие скорее различия использованных методов и объектов исследований.

В настоящей работе была поставлена задача на основе разработанного чувствительного датчика для прижизненной регистрации [^{31}P]ЯМР спектров мозга изучить динамику изменений уровней фосфатных метаболитов мозга крыс во время ишемии различной длительности.

Материалы и методы

Существенной характеристикой датчика ЯМР является его чувствительность, которая прямо связана с затратами времени на получение спектра с высоким отношением сигнал/шум. Чувствительность датчика ЯМР в свою очередь определяет возможность применения ЯМР спектроскопии в изучении быстропротекающих биологических процессов. Приводимые в литературе спектры [^{31}P]ЯМР органов *in vitro* и *in vivo*, как правило, требуют времени накопления сигналов ЯМР 5—20 мин.

Параметр чувствительности датчика ЯМР определяется выбором таких технических характеристик поверхностной катушки, как ее конфигурация и геометрические размеры. Дополнительным требованием к катушке является обеспечение высокой пространственной избирательности, то есть возможности регистрации сигнала ЯМР главным образом от изучаемого органа с минимальным вкладом сигналов от окружающих тканей. Эти требования во многом противоречивы, и в каждом конкретном случае требуется оптимальный выбор соответствующих параметров. Отношение сигнал/шум, развиваемое на входе предусилителя ЯМР спектрометра, определяется соотношением [9]

$$\text{сигнал/шум} \sim K n M_0 (Q \omega V / 4kT)^{1/2} \quad (1),$$

где K —коэффициент, определяемый геометрией приемной катушки; n —«коэффициент заполнения» объема катушки образцом; M_0 —ядерная намагниченность; Q —добротность катушки; ω —частота ларморовской прецессии; V —объем катушки; k —постоянная Больцмана; T —температура катушки.

Нами использована двухсекционная объемно-поверхностная катушка (рис. 1), которая позволяет существенно повысить чувствительность и избирательность ЯМР по сравнению с распространенной в ряде работ плоской поверхностной катушкой [10—12]. Очевидно, что геометрические особенности использованной катушки обеспечивают увеличение объема образца, захватываемого высокочастотным полем, и увеличивают параметр $nV^{1/2}$. Кроме того, магнитная компонента высокочастотного поля,

позбуждаемая двухсекционной катушкой, характеризуется в сравнении с плоскостной большей эффективностью составляющей в поперечном направлении к вектору постоянного магнитного поля (в соотношении (1) это учтено значением коэффициента K). Рассматриваемая двухсекционная объемно-поверхностная катушка была применена в разработанной нами конструкции датчика для ЯМР-Фурье спектрометра АМ-400 «Bruker» (рабочая частота 162 МГц для ядер фосфора), оснащенного сверхпроводящим магнитом с широким отверстием (теплое отверстие 89 мм). Датчик представляет собой полый дюралевый цилиндр диамет-



Рис. 1. Конфигурация двухсекционной двухвитковой поверхностной катушки
Рис. 2. Тестовый образец для эксперимента по оценке избирательности катушки: 1—раствор NAD; 2—фильтровальная бумага, пропитанная раствором P_1 ; 3—двухсекционная поверхностная катушка

ром 70 мм, внутри которого расположены элементы электронной схемы, приспособление для фиксации лабораторного животного, контактные разъемы для подключения датчиков физиологического контроля (ЭКГ, ЭЭГ, дыхания, pO_2 и др.). Фиксация животного осуществляется в специальной кассете из оргстекла, которая снабжена стереотаксическим устройством, обеспечивающим стандартизацию положения головы крысы относительно приемной поверхностной катушки.

Катушка выполнена из медного посеребренного провода диаметром 0,9 мм и установлена в датчик таким образом, чтобы плоскости секций были ориентированы параллельно вектору постоянного магнитного поля. Уменьшения диэлектрических потерь достигали использованием экрана Фарадея [13], выполненного в виде набора тонких эмалированных проводов между головой крысы и катушкой.

Пространственную избирательность датчика проверяли в серии экспериментов, в которой изучаемый объект (голова крысы) моделировался следующим образом: был изготовлен тестовый образец из слоя фильтровальной бумаги, пропитанной раствором P_1 , который имитировал верхние слои ткани головы крысы (кожа, мышцы, кости черепа), а также кювета с раствором NAD, имитирующая ткань головного мозга. Варьируя в эксперименте длительность зондирующего импульса при фиксированной временной задержке на релаксацию, мы добились того, что сигнал P_1 в спектрах $[^{31}P]$ ЯМР стал минимален при высоком уровне сигнала NAD (рис. 2, 3).

Аналогичные эксперименты были проведены с растворами других фосфорсодержащих метаболитов, регистрируемых в реальных экспериментах (АТР, КР) с тем, чтобы выяснить влияние на пространственную

избирательность различий во временах релаксации T_1 этих соединений. Значения длительности зондирующего импульса, при котором вклад верхнего слоя минимален, во всех экспериментах различались несущественно.

Регистрацию фосфорсодержащих метаболитов мозга крыс в дальнейшем проводили с использованием определенных в модельных экспериментах длительности зондирующего импульса (0,00003с) и временной задержки на релаксацию (0,3с), обеспечивающих минимальный вклад окружающих тканей в $[^{31}\text{P}]\text{ЯМР}$ спектры мозга. Кроме того, чувствительность разработанного датчика характеризовалась достаточно высоким отношением сигнал/шум. Спектры $[^{31}\text{P}]\text{ЯМР}$ мозга крыс *in vivo* с отношением сигнал/шум равным 8 могли быть получены за 30—60 с (рис. 4), что является принципиально важным в изучении динамики энергетических процессов в мозгу крыс в норме и при патологии.

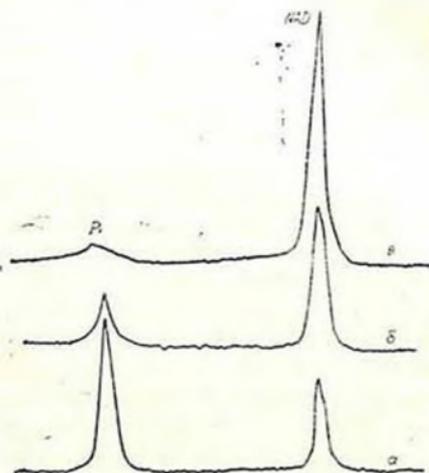


Рис. 3. Спектры $[^{31}\text{P}]\text{ЯМР}$, полученные в эксперименте по оценке избирательности поверхностной катушки: а—длительность зондирующего импульса 0,00001с; б—0,00002с; в—0,00003с. Задержка на релаксацию 0,3 с

Исследования динамики уровней макроэргических фосфатов мозга во время ишемии проведены на 27 белых беспородных крысах-самцах массой 150—255 г под тиопенталовым наркозом (80—90 мг/кг внутривенно). Животных содержали на обычном пищевом рационе вивария. За 12 ч до опыта их лишали пищи. Полную ишемию у крыс моделировали остановкой дыхания и кровообращения, что достигалось электрофибрилляцией мышцы сердца переменным электрическим током 27 В, который подавали на пару игольчатых электродов, закрепленных под кожей на грудной клетке в области сердца. Продолжительность действия электрического тока была равной 1—3 мин; в этот период у всех исследуемых животных развивалась полная остановка дыхания и сердечной деятельности. Последние контролировались по исчезновению электрической активности сердца (ЭКГ) и дыхательных движений с помощью электрокардиографа.

Перед фиксацией крыс в датчике ЯМР у наркотизированного животного скальпировали участок головы (1×2 см), к которому присоединяли катушку датчика с помощью встроенного стереотаксического устройства. Улучшения однородности магнитного поля B_0 добивались оптимизацией токов шиммовых катушек при наблюдении сигнала протонов тканевой воды.

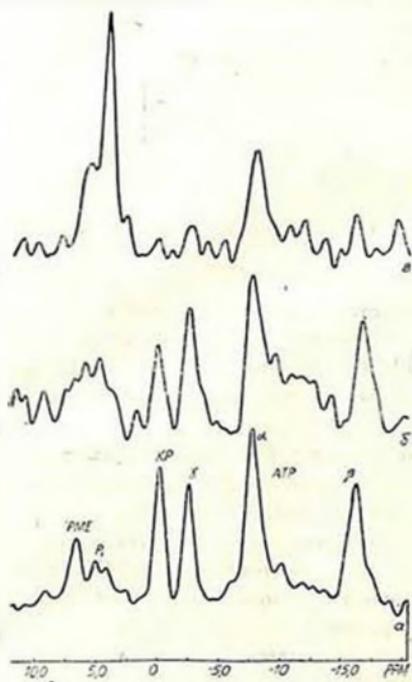


Рис. 4. Типичные $[^{31}\text{P}]$ ЯМР спектры мозга крысы *in vivo* (общее время накопления спектра 2 мин): а—контрольный спектр, б—на 2-й мин, в—на 8-й мин после остановки сердца. Одно деление шкалы химических сдвигов соответствует 1 м. д.

$[^{31}\text{P}]$ ЯМР спектры получали после Фурье-преобразования усредненных за 1,5—2 мин сигналов спада свободной индукции (когерентная сумма 150—300 сигналов для получения достаточно высокого отношения сигнал/шум). Регистрацию спектров вели на участке оперативной памяти ЭВМ объемом 1К, ширина спектра 7 КГц.

Поскольку задержка на релаксацию (0,3 с) короче времени релаксации T_1 любого из метаболитов, регистрируемых в $[^{31}\text{P}]$ ЯМР спектрах, соотношения интегральных интенсивностей спектральных линий не отражают, как правило, истинных концентраций, но изменения интегральных интенсивностей точно соответствуют содержанию метаболитов.

Исследование кинетики изменений энергетического метаболизма мозга при ишемии во всех экспериментах было однотипным: после снятия первых 3—4-х контрольных спектров на электроды, закрепленные на грудной клетке крыс, подавали ток и с началом остановки дыхания и сердечной деятельности каждую 1—2 мин регистрировали серию $[^{31}\text{P}]$ ЯМР спектров в процессе ишемии различной длительности.

Эксперимент полностью автоматизирован: сбор данных, запись их в долговременную память ЭВМ, обработку полученных спектров осуществляли на мини-ЭВМ спектрометра по специальной программе. Полученные серии спектров (25—30 спектров в серии) обрабатывали математически в ЭВМ с целью исключить из спектров широкий сигнал от фосфолипидов мозга (метод convolution difference [14]); затем определяли интегральные интенсивности линий в спектрах [^{31}P]ЯМР. Данные подвергали статистической обработке по критерию Стьюдента. Всего обработано свыше 700 спектров. Значение внутриклеточного pH_i вычисляли по формуле:

$$\text{pH}_i = 6,77 + \lg \frac{\delta P_i - 3,29}{5,68 - \delta P_i}$$

где δP_i —химический сдвиг сигнала P_i относительно сигнала КР [15].

Результаты и обсуждение

В интактном мозгу крыс среднестатистические показатели отношения интегральных интенсивностей сигналов КР/ P_i равны $2,17 \pm 0,03$; КР/ β -АТР $1,52 \pm 0,04$; АТР/ P_i $1,50 \pm 0,04$; внутриклеточное pH_i мозга составляет $7,14 \pm 0,01$. Эти результаты согласуются с данными Коор и соавт. и Petrofi и соавт. [6, 15].

На рис. 4 приведены типичные спектры [^{31}P]ЯМР мозга крысы в контроле, на 2- и 8-й мин после остановки сердца, демонстрирующие влияние ишемии на уровни фосфорных метаболитов. Уже в первые минуты ишемии наблюдается быстрое снижение уровней макроэргических фосфатов мозга, рост уровня P_i и фосфомоноэфиров (РМЕ) с одновременным развитием внутриклеточного ацидоза (рис. 5, 6). Другой закономерностью было наличие бифазного характера снижения интенсивностей сигналов КР и β -АТР, отличающегося наличием быстрой и медленной компонент снижения уровней.

В первой фазе (2—4 мин) интенсивность сигнала КР в спектрах [^{31}P]ЯМР снижалась на 50—40%, а сигналов P_i и РМЕ возрастала на 100—120%. В результате показатель КР/ P_i за это время стремительно падал до значений $0,41 \pm 0,05$ против $2,17 \pm 0,03$ в контроле. Внутриклеточное pH_i к 4-ой мин ишемии снижалось с $7,14 \pm 0,01$ в контроле до $6,77 \pm 0,05$ (рис. 6, б).

В подавляющем большинстве экспериментов (70%) снижение уровня АТР начиналось в первые минуты ишемии одновременно со снижением уровня КР. Через 4—6 мин интенсивность сигнала β -АТР в спектрах [^{31}P]ЯМР у всех исследуемых животных снижалась на 35—40% от контрольной (рис. 5, б).

Вместе с тем, у части животных (30%) в первые минуты ишемии регистрировалось заметное повышение уровня АТР (в среднем на 15—20%), показанное на рис. 5, 6 пунктирной линией. Отношение β -АТР/ P_i в динамике ишемии (рис. 6, а), как и отношение КР/ P_i быстро снижалось и к 4-ой мин достигало среднего значения $0,30 \pm 0,04$ против $1,50 \pm 0,04$ в контроле.

Во второй, медленной фазе (6—30 мин) наблюдались менее значительные сдвиги в уровнях макроэргических фосфатов. Если интенсивность сигналов КР и β -АТР через 6—10 мин ишемии падала на 60%, то к концу исследуемого периода (на 30-ой мин)—на 70—80%. В это же время уровень P_i продолжал нарастать, достигая к 16—20-ой мин максимальных значений 380—400%. Отношения КР/ P_i и β -АТР/ P_i во второй фазе оставались минимальными (0,2—0,15, в 10 раз ниже исходных). После быстрого роста в первой фазе уровня РМЕ наблюдается, начиная с 4—6-ой мин, постепенное его снижение по мере удлинения

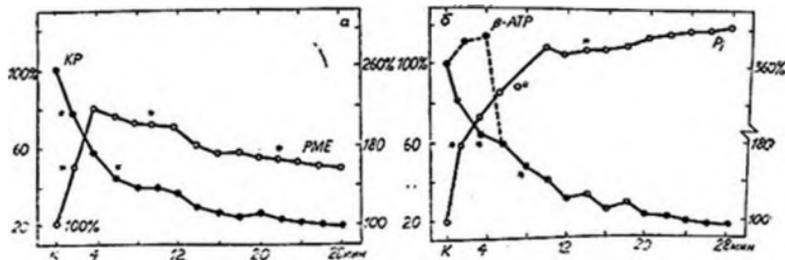


Рис. 5. Изменение интенсивности сигналов в $[^{31}\text{P}]$ ЯМР спектрах мозга крыс *in vivo* (в % от контроля—К) в динамике 30 мин ишемии. Каждая точка равна среднестатистическому значению ($M \pm m$) 10—15 опытов; * $p < 0,01$ по сравнению с контролем

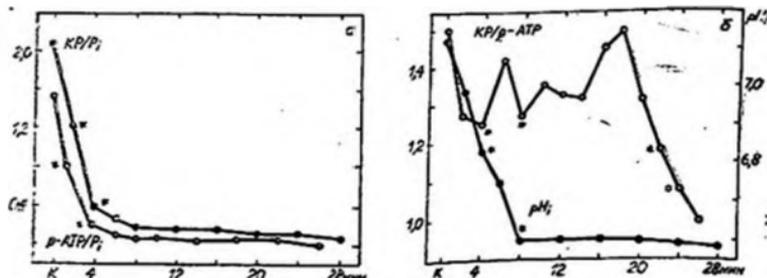


Рис. 6. Показатели биоэнергетики ($\text{КР}/P_i$, $\beta\text{-АТР}/P_i$; $\text{КР}/\beta\text{-АТР}$) и внутриклеточного ацидоза (pH_i) ткани мозга крыс в динамике 30 мин ишемии. Статистические данные те же, что и на рис. 5.

ишемического периода. Изменение показателя $\text{КР}/\beta\text{-АТР}$, отражающего взаимосвязь расходования этих макроэргов во время ишемии, имеет колебательный характер (рис. 6, 6). Падение этого отношения на 1—4-ой мин связано, по-видимому, с большей скоростью расходования КР по сравнению с АТР (креатинкиназная реакция); на 4—6-й мин рост этого показателя можно объяснить тем, что на этом этапе скорость распада АТР превышает скорость распада КР и т. д. К 8-ой мин кривая закисления выходит на плато и внутриклеточное pH_i достигает своего минимума $6,56 \pm 0,08$. К этому моменту отношение $\text{КР}/\beta\text{-АТР}$ возвра-

щается к значению, которое наблюдалось на 4-й мин ишемии. Дальнейшие колебания этого отношения пока трудно объяснить.

Обращает на себя внимание, что в наших экспериментах уровень КР падал медленнее, чем по данным Kaasik и соавт. [3], которые сообщали, что количество КР снижается до 0 спустя 1 мин ишемии. Наши результаты не подтверждают также данные Hillbergman и соавт. [18] об относительно устойчивом содержании АТР мозга пока соотношение КР/Р₁ не достигнет значения 0,5; при КР/Р₁=0,5 мы регистрировали уже довольно низкие уровни как КР, так и АТР.

Требует своего объяснения и наличие бифазного характера убывания сигналов КР и β-АТР. Petroff и соавт. [15] обнаружили бифазный характер исчезновения сигнала КР в спектрах [³¹P]ЯМР мозга кроликов; медленная компонента имела период полураспада около 1 ч, быстрая—порядка 1 мин. Авторами сделан вывод, что медленная компонента распада КР обусловлена вкладом в спектре [³¹P]ЯМР мозга сигналов от окружающих тканей (мышцы головы).

Мы проанализировали численными методами наши данные по убыванию сигналов КР и β-АТР путем аппроксимации экспериментальных точек теоретическими кривыми вида:

$$J = \sum_{i=1}^N J_i \exp\left(-k_i t\right),$$

где N выбирали равным 1, 2 или 3. Установлено, что экспериментальные точки убывания сигналов КР и β-АТР лучше всего ложатся (достигается минимум суммы квадратов отклонений) на теоретические кривые при N=2, что подтверждает, таким образом, бифазный характер расщепления макроэргов, причем быстрая компонента для КР имеет период полураспада около 1,3 мин, медленная—14,3 мин; для сигнала β-АТР соответственно 2,0 и 10,6 мин. Таким образом, медленная компонента убывания КР в нашем случае спадает в 4 раза быстрее, чем зарегистрировано в экспериментах Petroff и соавт. [15] и приписываемая ими мышечной ткани.

Чтобы окончательно убедиться в том, что мышечная ткань головы не влияет на регистрируемую в наших экспериментах медленную компоненту спада сигналов КР и β-АТР, мы определили периоды полураспада соответствующих сигналов в ткани скелетной мышцы крысы при ишемии. Протокол эксперимента аналогичен описанному выше, за исключением того, что поверхностную катушку накладывали на бедренную мышцу.

Анализ полученных результатов показал, что периоды полураспада КР мышцы составили около 0,3 мин (быстрый распад КР, вызванный контрактурой мышцы во время действия тока) и 40 мин; период полураспада АТР мышцы составил около 120 мин.

Таким образом, наличие бифазного характера распада макроэргов в ткани мозга не может быть объяснено вкладом мышц. Вероятно, бифазный характер обусловлен тем, что клетки головного мозга по-раз-

ному переживают состояние ишемии, и можно выделить по крайней мере два типа клеток, предположительно, глиальные и нейроны, для которых скорости расходования макроэргов сильно различаются. Это предположение вполне разумно, если учесть разную метаболическую активность этих клеток и данные об особой уязвимости нейронов в условиях гипоксии и ишемии [16].

С другой стороны, бифазный характер может быть обусловлен прогрессирующими с углублением тяжести ишемии повреждениями мембранных структур и ферментных систем. В пользу этого механизма свидетельствует зарегистрированное нами увеличение во время ишемии сигнала PME (рис. 5, а), что связано с ростом внутриклеточного содержания фосфоэтаноламина, одного из структурных фрагментов мембранных липидов мозга [6]. В результате быстроразвивающихся структурных нарушений мембран клетки может происходить модификация ферментных систем и изменение их активности, следовательно, скоростей катализируемых ими реакций. Так, например, известно, что при ишемии вследствие структурной дезорганизации мембран происходит выход из нервной ткани в СМЖ фермента креатинкиназы [16, 17].

Таким образом, представленные данные позволили обнаружить ряд закономерностей динамики уровней макроэргических фосфатов мозга во время ишемии. Определены темпы снижения макроэргов, нарастания P_i и фосфомоноэфиров, а также развития внутриклеточного ацидоза. Установлен бифазный характер изменения внутриклеточного содержания креатинфосфата и АТФ в ишемической ткани мозга.

DYNAMICS OF CEREBRAL METABOLISM DURING ISCHEMIA BY ^{31}P -NMR SPECTROSCOPY DATA

LIKHODY S. St., *LIKHODY St. S., SIBELDINA L. A., SEMIONOVA N. A.

Institute of Chemical Physics USSR Acad. Sci., Moscow

*Medical Institute, Faculty of Biochemistry, Tselinograd

A probehead with a surface coil to record ^{31}P NMR spectra of rat brain in vivo is built.

The probehead is characterized by high sensitivity and space selectivity due to the advantageous configuration of surface coil. The developed construction permits to reduce essentially the time of rat brain spectrum acquisition up to 30–60 seconds and to investigate the dynamics of fast energetic processes in nervous tissue in vivo.

The dynamics of changes in the rat brain phosphorous metabolites during 30 minutes of complete ischemia was studied by means of ^{31}P -NMR in vivo. A rapid decrease in phosphocreatine and ATP reserves accompanied by an increase in P_i , phosphomonoesters levels and simultaneous development of intracellular acidosis were detected. The complete disappearance of phosphocreatine and ATP resonances was revealed to be biphasic. Possible mechanisms of established changes in the levels of macroergic compounds are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Siesjo B. K. J. Neurosurg.*, v. 60, p. 883—908, 1984.
2. *Луходий Ст. С.*—В кн.: *Нарушения гомеостаза при экстремальных и терминальных состояниях* (под ред. В. Г. Корпачева), с. 5—12, Новосибирск, 1981.
3. *Winn R. H., Rubio R., Bezne R. M. Circulat. Res.*, v. 45, p. 486—492, 1979.
4. *Kaasik A. E., Nilsson L., Siesjo B. K. Acta physiol. scand.*, v. 78, p. 433—447, 1970.
5. *Тсельпухов В. И., Тренин С. О., Князев Г. Д., Лапкина Т. И.* Вестн. Акад. мед. наук СССР, № 4, с. 1—96, 1985.
6. *Kopp S. J., Krigstein J., Freidank A., Rachman A., Selbert A., Cohen M. M. J. Neurochem.*, v. 43, p. 1716—1731, 1984.
7. *Litt L., Gonzalez-Mendez R., Severinghaus S. W., Hamilton W. K., Weinstein Ph. R.* Magn. Reson. in Medicine, v. 3, p. 619—625, 1986.
8. *Jackson D. J., Krywawych S., Tofts P., Wray S. J. Physiol. (Gr. Brit.)*, v. 360, p. 80, 1985.
9. *Hoult D. T., Richards R. E. J. Mag. Reson.*, v. 24, p. 71, 1976.
10. *Ackerman T. T. H., Grove T. H., Wong G. G., Gadian D. G., Radda G. K. Nature*, v. 283, p. 167, 1980.
11. *Behar K. L., den Hollander T. A., Petroff O. A. C., Hetherington H. P., Pritchard J. W., Shulman R. G. J. Neurochem.*, v. 44, p. 1045—1055, 1985.
12. *Шкарик П. Ю., Самойленко А. А., Сибелькина Л. А.* Биофизика, т. 28, № 1, с. 122, 1983.
13. *Gadian D. G., Robinson F. N. H. J. Mag. Reson.*, v. 34, p. 449, 1979.
14. *Campbell J. D., Dobson C. M., Williams R. J. P., Xavier A. J. Magn. Reson.*, v. 54, p. 172, 1975.
15. *Petroff O. A. C., Pritchard J. W., Behar K. L., Alger J. R. Neurology*, v. 35, p. 781—788, 1985.
16. *Нелюцкий В. А., Гурвич А. М., Золотокрылина Е. С.*—В кн.: *Постренимационная болезнь*, с. 183—195, М., Медицина, 1987.
17. *Bohmer T., Kjekshus J., Vaagenes P. Scand. J. Clin. and Lab. Invest.*, v. 43, p. 261—265, 1983.
18. *Hillberman M., Subramanian V. H., Helweg-Gras J., Cone J. B., Egan S. W., Gyulal L., Chance B. J. Cerebr. Blood Flow and Metab.*, № 4, p. 334—342, 1984.

Поступила 15. III 1988



КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 547.963.3

ОБНАРУЖЕНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ *Ki-ras* ПОДОБНЫХ
НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ
ПРОТООНКОГЕНА *ras* В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО
МОЗГА КРЫСЫ

СКОБЕЛЕВА Н. А., АМБАРЦУМЯН Н. С., ЗАХАРЯН Р. А.

Институт экспериментальной биологии АН АрмССР, Ереван

В геноме всех исследованных к настоящему времени эукариотических организмов содержится по крайней мере по одному представителю семейства генов *ras* [1, 2]. Эти гены были выявлены впервые как трансформирующие гены онкогенных вирусов саркомы крыс Харви и Кирстен (*Ki-MSV*, *Ha-MSV*). Мутантные гены семейства *ras* способны трансформировать фибробласты к опухолевому фенотипу [3]. Эволюционная консервативность генов, как и их трансформирующая активность, характерные для мутантных вариантов, позволяют предположить, что гены семейства *ras* играют существенную роль в пролиферации клеток и их дифференцировке в организме [4]. Транскрипция каждого протоонкогена, видимо, контролируется независимо в каждой ткани, поэтому уровни транскрипции различных онкогенов в тканях сильно варьируют. Показано, что гены семейства *ras* дифференциально экспрессируются в различных тканях мыши [5].

При инфекции культуры нервных клеток *Ki-* и *Ha-MSV* приостанавливается рост клеток и индуцируется их дифференцировка [6]. Обнаруживаются *ras*-специфические транскрипты и в дифференцированной нервной ткани у *D. melanogaster* [7]. В нервных тканях как млекопитающих, так и *D. melanogaster*, показан также высокий уровень экспрессии другого протоонкогена—*c-src* [8, 9]. Можно предположить, что некоторые протоонкогены играют определенную роль в поддержании дифференцированного статуса нервных клеток.

Целью настоящей работы было исследование возможности транскрипции последовательностей протоонкогена *ras* в клетках мозга крысы.

В работе были использованы dNTP («Amersham», Англия), [³²P]-dNTP—(В.О. «Изотоп», Ташкент), агароза, трис, хлорамфеникол, лизоцим, бромид этидия («Sigma», США), нитроцеллюлозные филь-

тры («Millipore», США), GF/C фильтры («Whatman», Англия), сефадекс G-50, fine («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция), дрожжевой экстракт, триптон, агар («Difco», США), ДНК-полимераза I из *E. coli*, рестриктазы—(П О «Фермент», Вильнюс) и другие реактивы аналитической чистоты.

Выделение из мозга крысы свободных полисом и полисомной РНК, получение поли(А)-РНК описано ранее [10]. На поли(А)-РНК—матрице, выделенной из мозга крысы, синтезированы структурные гены, последовательным действием ревертазы, ДНК-полимеразы I и S1 нуклеазы. Полученные структурные гены клонированы: в пекторе рBR 322 методом дГ—дЦ коннекторов по участку узнавания рестрикционной эндонуклеазой PstI [11].

Рекомбинантные клоны анализировали с помощью метода гибридизации колоний, используя в качестве «молекулярного зонда» меченый в системе ник-трансляции 1 кб. фрагмент *Ki-ras*-гена (У. А. $2 \cdot 10^5$ имп/мин/мкг), полученный из плазмиды Hi-Hi-3 [12] при обработке рестриктазой EcoRI и элюированный из низкоплавкой агарозы. Из 1,5 тысяч проанализированных клонов методом гибридизации колоний выявлено 2 клон, содержащих последовательности ДНК, гибридизирующиеся с этим «молекулярным зондом». Из одного гибридизирующегося клона выделена и очищена плазмидная ДНК, обозначенная нами как плазида рRK-1.

Метод клонирования структурных генов с помощью дГ—дЦ коннекторов по участку узнавания рестриктазой PstI удобен тем, что встроенная в плазмиду ДНК может быть выщеплена из рекомбинантной плазмиды с помощью этой же рестриктазы, что свидетельствует о восстановлении участка узнавания рестриктазы PstI по обеим сторонам от вставки ДНК. После обработки рекомбинантной плазмиды рRK-1 рестриктазой PstI и электрофореза в 1%-ной агарозе полученных продуктов рестрикции обнаруживается выщепляющийся фрагмент ДНК, размером ~450 пар оснований (п. о.) (рис. 1, а).

Доказательством того, что фрагмент, образующийся при обработке плазмиды рRK-1 рестриктазой PstI, действительно содержит *Ki-ras*-подобные последовательности, служат опыты по блот-гибридизации этого фрагмента с [32 P]ДНК, синтезированной в системе ник-трансляции по матрице *Ki-ras* фрагмента, выделенного из плазмиды Hi-Hi-3 (рис. 1, з).

Обработка плазмиды рRK-1 рестриктазами EcoRI, PvuII и SalGI показала, что во встроенной ДНК нет участков узнавания для рестриктаз EcoRI и SalGI, тогда как рестриктаза PvuII отщепляет от встроенной ДНК фрагмент размером ~60 пар оснований (рис. 1, б).

Методом блот-гибридизации проведен анализ РНК, выделенных из мозга крысы. Для этого РНК, выделенная из свободных полисом мозга крыс, разгонялась электрофорезом в 1,2%-ной агарозе, содержащей формальдегид, после чего продукты электрофореза переносили на нитроцеллюлозный фильтр [14] и гибридизовали с [32 P]ДНК, меченой в системе ник-трансляции по матрице плазмидной ДНК рRK-1 и Hi-Hi-3 (рис. 2). При гибридизации с двумя плазмидами выявлены

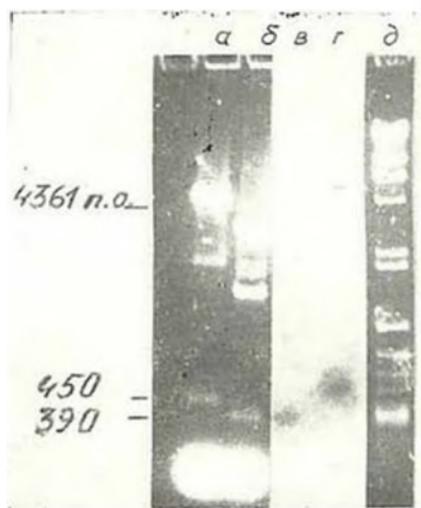


Рис. 1. Электрофорез в 1% -ной агарозе плазмиды pRK-1 после разщепления рестриктазой PstI (а), PstI + PvuII (б). После электрофореза фрагменты ДНК перенесли на нитроцеллюлозный фильтр и проводим гибринизацию по Southern [13]. Гибринизация меченой [³²P] ДНК Ki-gas с плазмидой pRK-1, обработанной рестриктазами PstI + PvuII (а) и PstI (б). В качестве маркеров использованы фрагменты ДНК флага λ, после обработки рестриктазой HindIII, ДНК ΦX-174 RF после обработки рестриктазой PstI (а)

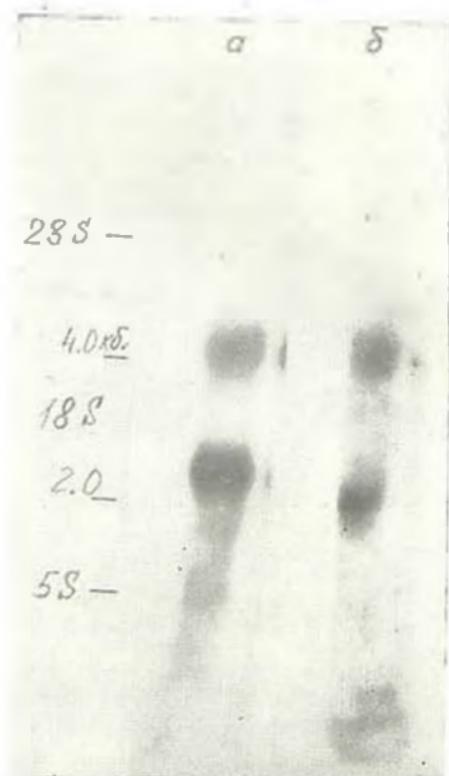


Рис. 2. Определение размеров рРНК, гибридирующихся с [32 P]-ДНК плазмиды ПИ-ПН-3 (а) и рРК-1 (б), после электрофореза в 1,2%-ной агарозе с формальдегидом и переноса рРНК на нитроцеллюлозный фильтр. В качестве маркеров использованы 28S, 18S и 5S рРНК кб (тысяча оснований)

2 зоны гибридизации РНК в районе ~ 4,0 и 2,0 кб. Ранее было показано, что в процессе развития мышечных эмбрионов происходит транскрипция 2-х с—*ras-Ki* мРНК, размеры которых соответствуют 2,0 и 4,4 кб. [15]. Совпадение размеров РНК, гибридизующихся с плазмидами рRK-1 и Hi-Hi-3 указывает на то, что выделенный нами клон действительно содержит *Ki-ras*-подобные последовательности.

Исходя из полученных нами данных, можно предположить, что в клетках мозга крысы происходит транскрипция протоонкогена *Ki-ras*, и нами получена плазмида, содержащая *Ki-ras*-подобные последовательности ДНК. Дальнейший анализ первичной структуры ДНК плазмиды рRK-1 позволит идентифицировать ген, возможно, относящийся к семейству генов *ras*.

DETERMINATION OF TRANSCRIPTION OF *ras* PROTOONCOGENE NUCLEOTIDE SEQUENCES SIMILAR TO *Ki-ras* IN RAT BRAIN CELLS

SKOBELEVA N. A., HAMBARTSUMYAN N. S., ZAKHARYAN R. A.
Institute of Experimental Biology Armenian Acad. Sci., Yerevan

A cDNA clone containing sequences similar to *Ki-ras* was isolated from rat brain cDNA library. In rat brain cells the sequences of protooncogene *Ki-ras* were proposed to be transcribed and a recombinant plasmid containing such sequences was obtained.

ЛИТЕРАТУРА

1. Shilo W., Weinberg R. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci. v. 78, № 11, p. 6789—6792, 1981.
2. Lowy D., Willamsen B. Cancer Surv. v. 5, № 2, p. 275—289, 1986.
3. Bishop J. M. Science, v. 235, № 4790, p. 305—311, 1987.
4. Slamon D. J., Cline M. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci. v. 81, № 22, p. 7141—7146, 1986.
5. Spandidos D. A., Dimitrov I. Biosci. Repts. v. 5, № 12, p. 1035—1039, 1985.
6. Noda M., Ko M., Ogura A., Liu W., Amano T., Takano A., Ikawa J. Nature, v. 318, № 6012, p. 73—75, 1985.
7. Segal D., Shilo B. Z. Mol. and Cell. Biol. v. 6, № 6, p. 2241—2248, 1986.
8. Brugge J. S., Cotton P. C., Quarral A. E., Barrett S. N., Nanner D., Keane R. W. Nature, v. 316, № 6028, p. 554—557, 1985.
9. Martinez R., Mathey-Prevot B., Bernards A., Baltimore D. Science, v. 237, № 4813, p. 411—415, 1987.
10. Скобелева Н. А., Бухман В. А., Захарян Р. А., Назарян К. Б., Казарян Б. А. Нейрохимия, т. 3, № 3, с. 280—283, 1984.
11. Скобелева Н. А., Захарян Р. А., Назарян К. Б., Казарян Б. А. Нейрохимия, т. 6, № 6, с. 506—511, 1987.
12. Ellis R. W., DeFeo D., Shin T. V., Gunde M. A., Young H. A., Tsuchida N., Lowy D. R., Scolnick E. M. Nature, v. 292, № 5708, p. 505—511, 1981.
13. Southern E. M. J. Mol. Biol., v. 98, № 3, p. 503—517, 1975.
14. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular Cloning: a Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY), 1982.
15. Muller R., Slamon D. J., Adamson E. D., Tremblay J. M., Muller D., Cline M. J., Verma J. Molec. Cell. Biol., v. 3, № 3, p. 1062—1069, 1983.

Поступила 28. III 1988



УДК 616—008.9:547.963.3

ОБМЕН УРИДИЛОВЫХ И ЦИТИДИЛОВЫХ НУКЛЕОТИДОВ
В ГОЛОВНОМ МОЗГУ

НАГИЕВ Э. Р.

Одесский медицинский институт им. Н. И. Пирогова

Нуклеозидтрифосфаты составляют до 80% общего содержания нуклеотидов в тканях у млекопитающих [1, 2]. Пиримидиновые трифосфаты—УТР и СТР, наряду с другими нуклеозидтрифосфатами, используются для синтеза нуклеиновых кислот; кроме того, участвуют в биосинтезе гликогена, фосфолипидов, во взаимопревращениях различных сахаров [3, 2].

Однако, несмотря на это, содержание и обмен указанных соединений в различных органах, в том числе в мозгу, недостаточно исследованы не только при различных патологических состояниях, но и в норме. В частности, в литературе отсутствуют сведения об активности ферментов синтеза и катаболизма пиримидиновых нуклеозидполифосфатов.

В связи с этим, целью настоящей работы являлось комплексное изучение содержания уридилловых и цитидилловых нуклеотидов с одновременным исследованием активности ферментов, катализирующих синтез (нуклеозидмонофосфаткиназа, КФ 2.7.4.4 и нуклеозиддифосфаткиназа, КФ 2.7.4.6) и катаболизм (нуклеозиддифосфатаза, КФ 3.6.1.6 и нуклеозидтрифосфатаза, КФ 3.6.1.15) указанных нуклеотидов в ткани головного мозга интактных крыс.

Исследования проводили на белых крысах-самцах линии *Wistar*, массой 180—200 г. Животных быстро декапитировали. Головной мозг при определении содержания нуклеотидов замораживали в жидком азоте. Нуклеотиды исследовали методом анионообменной хроматографии [4]. Количество уридилловых и цитидилловых нуклеотидов при выходе их отдельных форм с другими нуклеотидами определяли по сравнительному соотношению их экстинций при 260 и 280 нм. Количество нуклеотидов выражали в мкмоль/г ткани.

Митохондрии выделяли из гомогенатов головного мозга методом дифференцированного центрифугирования [5]. Нуклеозидмонофосфаткиназную и нуклеозиддифосфаткиназную активности определяли по приросту [^{14}C]UDP из [^{14}C]UMP и [^{14}C]UTP из [^{14}C]UDP соответственно (пмоль/мг белка/60 мин) [6]. Нуклеотиды в этом случае определяли с помощью ТСХ на ДЭАЭ-ц [7]. Радиоактивность проб считали на жидкостном сцинтилляционном счетчике СБС-2.

Нуклеозиддифосфатазную и нуклеозидтрифосфатазную активности исследовали с использованием в качестве субстратов для ферментативных реакций UDP, CDP, UTP, CTP и оценивали по приросту P_i (мкмоль/мг белка/60 мин) [8]. Белок в пробах определяли микробиуретовым методом [9]. Результаты исследований обработаны статистически с использованием общепринятых методов вариационной статистики.

Таблица 1

Содержание уридилowych и цитидилowych нуклеотидов в головном мозгу крыс (n=8)

Нуклеотиды	Содержание (мкмоль/г ткани)
UTP	0,053±0,007
UDP	0,072±0,005
UMP	0,024±0,002
CDP	0,022±0,002
CMP	0,059±0,005

Примечание. Здесь и в табл. 2 n—количество опытов.

Как показали проведенные исследования, в ткани головного мозга довольно активно протекают процессы обмена уридилowych и цитидилowych нуклеотидов. Данные по содержанию указанных нуклеозидфосфатов в головном мозгу интактных животных представлены в табл. 1. Обращает на себя внимание, что количество уридилowych нуклеотидов, среди которых прежде всего представлен UDP, существенно превышает содержание цитидилowych. Так, например, количество CDP составляет всего лишь 30% от уровня UDP. Содержание UTP в ткани головного мозга равно $0,063 \pm 0,007$ мкмоль, в то время как уровень CTP ниже чувствительности данного метода исследования и практически не обнаруживается. Интересно отметить, что в отношении содержания пириимидиновых нуклеозидмонофосфатов наблюдается противоположная тенденция. Так, количество UMP значительно ниже содержания CMP и составляет примерно 35% от уровня последнего.

В связи с изложенным, большой интерес вызывает исследование активности ферментов, катализирующих синтез и катаболизм непосредственно нуклеозидфосфатов. Проведенные исследования показали, что активность нуклеозидмонофосфаткиназы в головном мозгу интактных крыс составила $7,120 \pm 0,103$ пмоль, а нуклеозиддифосфаткиназная активность $2,054 \pm 0,083$ пмоль (митохондрии) и $6,550 \pm 0,212$ пмоль (постмитохондриальный супернатант).

Таким образом, в исследованных фракциях головного мозга интактных крыс обнаружена довольно высокая активность ферментов, катализирующих конечные этапы биосинтеза пириимидиновых нуклеотидов.

Как известно, динамическое равновесие нуклеотидного фонда обеспечивается равномерным функционированием как анаболических, так и катаболических реакций. Из табл. 2 видно, что в ткани головного мозга интенсивно осуществляются процессы ферментативного расщепления уридилowych и цитидилowych нуклеотидов. В митохондриях головного мозга

UDPазная активность составляет $0,483 \pm 0,033$ мкмоль, а в супернатанте она почти в два раза ниже. Подобная закономерность наблюдается и в отношении CDPазной активности исследуемых фракций. В частности, в супернатанте она составляет $0,249 \pm 0,018$ мкмоль, а в митохондриях более чем в 1,5 раза выше. Таким образом, процессы ферментативного расщепления пиримидиновых нуклеозиддифосфатов более интенсивно протекают в митохондриальной фракции ткани головного мозга. Следует отметить, что если гидролитическая активность в клеточных фракциях головного мозга по отношению к UDP и CDP примерно одинакова, то в отношении нуклеозидтрифосфатазы, катализирующей дефосфорилирование UTP и CTP, имеются существенные различия. Например, UTPазная активность в исследуемых фракциях заметно выше CTPазной, которая составляет по отношению к первой примерно 84% (митохондрии) и 79% (супернатант). Следует отметить, что активность нуклео-

Таблица 2

Активность нуклеозиддифосфатазы и нуклеозидтрифосфатазы, дефосфорилирующих UDP, CDP, UTP и CTP в головном мозгу крыс (мкмоль P/мг белка/60 мин) (n = 12)

Нуклеозидфосфатазы	Митохондрии	Постмитохондриальный супернатант
UDPаза	$0,483 \pm 0,033$	$0,256 \pm 0,015$
CDPаза	$0,448 \pm 0,027$	$0,249 \pm 0,018$
UTPаза	$0,922 \pm 0,072$	$0,571 \pm 0,049$
CTPаза	$0,774 \pm 0,053$	$0,455 \pm 0,029$

зиддифосфатаз и нуклеозидтрифосфатаз наиболее выражена в митохондриальной фракции. Кроме того, процессы ферментативного расщепления уридилловых нуклеотидов протекают более интенсивно по сравнению с цитидиловыми.

При анализе полученных данных обращает на себя внимание также относительно высокое содержание цитидиловых нуклеотидов в головном мозгу по сравнению с другими органами. В ткани головного мозга сумма цитидиловых нуклеотидов составляет около 57% от суммарного содержания уридилловых, в то же время в печени и легких она составляет в среднем 25—30% [10, 11]. По всей видимости, сравнительно высокое содержание цитидиловых нуклеотидов в головном мозгу свидетельствует об их важной роли для биосинтеза фосфолипидов, составляющих более 60% всех липидов мозга [12], а сравнительно низкий уровень уридилловых нуклеотидов по сравнению с другими органами, вероятно, обусловлен меньшей интенсивностью анаболических реакций обмена углеводов, в которых участвуют уридилловые коферменты, в частности синтеза и депонирования гликогена [13].

Проведенные исследования позволяют заключить, что в ткани головного мозга нитактных животных довольно активно протекают процессы метаболизма уридилловых и цитидиловых нуклеозидфосфатов. Учитывая важнейшую роль указанных нуклеотидов в различных функциях

организма—от энергообеспечения до построения молекул нуклеиновых кислот—весьма существенное значение приобретает изучение данных процессов обмена при различных патологических состояниях организма, сопровождающихся нарушениями деятельности ЦНС.

METABOLISM OF URIDINE AND CYTIDINE NUCLEOTIDES IN THE INTACT ANIMALS BRAIN

NAGIEV E. R.

N. I. Pirogov Odessa Medical Institute

The content of uridine and cytidine nucleotides and the activity of the main enzymes catalysing their biosynthesis (nucleoside monophosphate kinase, EC 2.7.4.4, and nucleoside diphosphate kinase, EC 2.7.4.6.) and catabolism (nucleoside diphosphatase, EC 3.6.1.6, and nucleoside triphosphatase, EC 3.6.1.15) have been studied in the intact animals brain tissue. It has been established that the metabolism of uridine and cytidine nucleotides proceeded there enough actively. The amount of uridine nucleotide phosphate considerably exceeds the level of cytidine derivatives. Activity of the enzymes splitting of pyrimidine nucleoside di- and triphosphates was higher in mitochondria than in postmitochondrial supernatant. Enzymatic dephosphorylation of uridine nucleotides in brain cellular fractions proceed more intensively than that of cytidine nucleotides.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Edel S., Rein-Loxtrup H. Bull. Soc. chim. Biol., v. 48, № 8—9, p. 9115—9133, 1966.
2. Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке. т. 3. М., Мир, 1982.
3. Pechan J., Halecak L., Liska B. Bratisl. lek. listy., v. 74, № 1, p. 30—36, 1980.
4. Назиев Э. Р., Савицкий И. В. Нейрохимия, т. 3, № 2, с. 172—177, 1984.
5. Hogeboom G. H., Schneider W. C., Pallade G. E. J. Biol. Chem., v. 172, № 2, p. 619—635, 1948.
6. Савицкий И. В., Назиев Э. Р. Радиобиология, т. 23, № 2, с. 237—240, 1983.
7. Третьяков А. В., Мухомов А. Г. Вопр. онкологии, т. 22, № 7, с. 65—67, 1976.
8. Скудачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., Изд. АН СССР, 1962.
9. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., Высшая школа, 1971.
10. Vazizolli V., Raquinelli V., Moruzzi M. Boll. Soc. Ital. Biol. Sperim., v. 44 № 3, p. 197—200, 1968.
11. Цеслова И. А. Укр. биохим. журн., т. 44, № 4, с. 531—535, 1972.
12. Хорет А. Молекулярные основы патогенеза болезней. М., Медицина, 1982.
13. Payne R. C., Tract T. W. Anal. Biochem., v. 121, № 1, p. 49—54, 1982.

Поступила 13. XII 1987



УДК 547.314.2+611.814.1—02.616.45—001.1/3

АКТИВНОСТЬ ХОЛИНАЦЕТИЛТРАНСФЕРАЗЫ И
АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ В ГИПОТАЛАМУСЕ
КРЫС ПРИ ОХЛАЖДЕНИИ И ИММОБИЛИЗАЦИИ

*ГУРИН В. Н., СЕМЕНЕНЯ И. Н.

*Институт физиологии АН БССР;
Медицинский институт, Минск

Имеется немало сведений о том, что ведущую роль в пусковых механизмах стресса могут играть холинореактивные системы мозга [1—5]. В настоящее время установлено, что они являются важнейшим каналом центральных влияний на метаболизм и активность функциональных систем организма. Определено, что скорость оборота АХ, о которой можно судить по активности ферментов синтеза и распада медиатора—холинацетилтрансферазы (ХАТ) и АХЭ, а также по изменению содержания АХ при раздельном введении ингибиторов ХАТ и АХЭ, заметно меняется в разных отделах мозга при действии на организм температурных [3, 6—9] и эмоциогенных [3, 4, 10] факторов. Требуется изучения вопрос о том, как изменяется состояние системы обмена АХ в гипоталамусе при кратковременном холодовом и эмоциональном стрессе.

Целью настоящей работы явилось изучение активности ХАТ и АХЭ в переднем (ПГ) и заднем (ЗГ) отделах гипоталамуса крыс при охлаждении, вызывающем развитие неглубокой гипотермии, и иммобилизации, приводящей к эмоциональному стрессу у животных.

В опытах использовали белых беспородных самок крыс массой 180—200 г. Животных охлаждали в воде с температурой 24—25° 15, 30 и 60 мин. В течение такого же времени крыс иммобилизовали, привлекая их за лапки к дощечкам брюшком кверху. Сразу после воздействия животных декапитировали и выделяли гипоталамус, разделяя его на ПГ и ЗГ. Для изучения активности ХАТ использовали радиохимический метод [11], основанный на определении образующегося в среде инкубации меченого АХ, содержание которого выражали в имп/мин/мг ткани гипоталамуса. Радиоактивность проб измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Magk-III» (США). Для выявления АХЭ использовали гистохимическую методику [12]. Об активности фермента судили по оптической плотности ферроцианида меди—конечного продук-

та реакции, происходящей при инкубации срезов гипоталамуса в среде с йодидом ацетилхолина—субстратом АХЭ. Препараты фотометрировали при длине волны 490 нм с помощью системы анализа изображения ТАС («Leitz», ФРГ), специально приспособленной для измерения оптической плотности [13]. В каждом препарате измеряли не менее 100 клеток при увеличении в 1500 раз. Данные фотометрирования обрабатывали автоматически с построением гистограмм распределения оптической плотности цитоплазмы нейронов. Полученный цифровой материал обработан методами вариационной статистики. В тексте приводятся только достоверные данные.

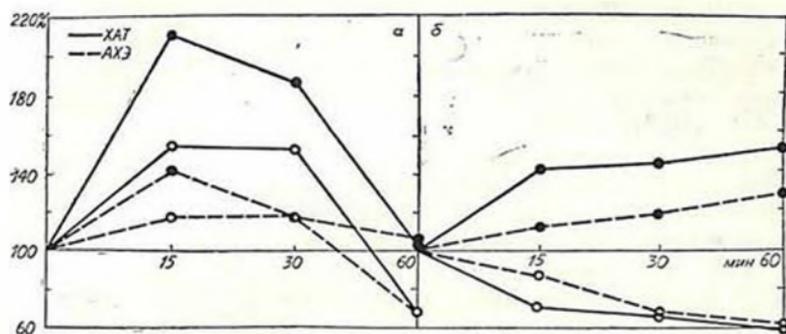


Рис. Изменения активности холинацетилтрансферазы (ХАТ) и АХЭ в переднем (О) и заднем (⊗) отделах гипоталамуса крысы при охлаждении (а) и иммобилизации (б). За 100% принят уровень активности ферментов у интактных животных

Результаты проведенных экспериментов показали, что 15-минутное охлаждение крыс, приводящее к снижению ректальной температуры (РТ) до $32,2^{\circ}$, сопровождалось увеличением активности ХАТ в ПГ на 55,3%, а в ЗГ—на 112,8% (рисунок, а). После 30-минутного охлаждения животных (РТ— $29,6^{\circ}$) активность фермента была повышена в ПГ и ЗГ на 54,3% и 87,9% соответственно. Пребывание крыс в воде в течение часа, сопровождавшееся падением РТ до $27,3^{\circ}$, приводило к снижению активности ХАТ в ПГ на 30,4% при отсутствии достоверных изменений активности этого фермента в ЗГ. Между изменениями активности ХАТ в ПГ и ЗГ в этих опытах выявлена высокая прямая корреляция ($r=+0,93$).

Активность АХЭ после 15-минутного охлаждения увеличивалась в ПГ на 18,0% и в ЗГ на 41,3% (рисунок, а). Через 30 мин охлаждения величина прироста активности фермента в ПГ составляла 19,0%, а в ЗГ—18,0%. Часовое пребывание крыс в воде сопровождалось снижением активности АХЭ в ПГ на 31,3%. В ЗГ величина активности фермента превышала контрольное значение на 6,2%. Обнаружена прямая средняя корреляция между активностью АХЭ в ПГ и ЗГ ($r=+0,62$).

Высокая прямая корреляция выявлена между изменениями активности ХАТ и АХЭ в ПГ ($r = +0,96$) и ЗГ ($r = +0,92$).

Иммобилизация крыс в течение 30 мин приводила к уменьшению активности ХАТ в ПГ на 32,8% (рисунок, б). После часового воздействия скорость синтеза АХ в ПГ снижалась на 39,3%, а в ЗГ увеличивалась на 53,6%. Коэффициент корреляции между изменениями активности ХАТ в ПГ и ЗГ отрицательный ($r = -0,99$ —почти полная обратная корреляция).

Активность АХЭ после 15-минутной иммобилизации снижалась в ПГ и повышалась в ЗГ на 12,4% (рисунок, б). После получасовой фиксации животных величина снижения активности фермента в ПГ составляла 30,1%, а в ЗГ активность АХЭ повышалась на 19,8%. Иммобилизация крыс в течение 60 мин приводила к снижению активности фермента в ПГ на 37,4% и увеличению в ЗГ на 29,3%. Коэффициент корреляции между изменениями активности АХЭ в ПГ и ЗГ отрицательный ($r = -0,98$). Высокая прямая корреляция выявлена между сдвигами активности ХАТ и АХЭ в ПГ ($r = +0,91$) и ЗГ ($r = +0,92$).

Полученные данные свидетельствуют, что при охлаждении и иммобилизации животных происходят существенные изменения скорости обмена важнейшего нейромедиатора—АХ, играющего значительную роль в центральных механизмах формирования срочной адаптации при действии на организм чрезвычайных раздражителей. Холодовой стресс сопровождается увеличением скорости синтеза и распада АХ в ПГ и ЗГ в начале развития гипотермии, что отражает повышение функциональной активности холинергических нейронов гипоталамуса. Последующее ее уменьшение по мере снижения температуры тела обусловлено, вероятно, холодовым угнетением метаболизма в ткани мозга. Иммобилизационный стресс характеризуется реципрокными изменениями скорости оборота медиатора в ПГ и ЗГ—повышение интенсивности процессов синтеза и распада АХ в ЗГ сочетается с уменьшением активности этих процессов в ПГ. Начальное повышение функциональной активности холинергических нейронов в ПГ и ЗГ при охлаждении и в ЗГ при иммобилизации животных отражает, вероятно, мобилизирующее влияние гипоталамуса на процессы энергетического и пластического обеспечения функций при стрессовых воздействиях.

THE ACTIVITY OF CHOLINE ACETYLTRANSFERASE AND ACETYLCHOLINE ESTERASE IN RAT HYPOTHALAMUS AT COOLING AND IMMOBILIZATION

GOURIN V. N., SEMENENYA I. N.

The Institute of Physiology of the Byelorussian Academy of Sciences,
the Medical Institute, Minsk

Changes in the activity of choline acetyltransferase (ChAT) and acetylcholine esterase (AChE) in the front (FP) and back (BP) parts of hypothalamus at short-term (15, 30 and 60 min) cooling and immo-

bilization were studied in the experiments on with mongrel femal rats (body weight 180—200 gl. The results of experiments have showed that at the beginning of the cooling influence ChAT and AChE activity in BP and FP increases with the following decrease as the body temperature lowers. Animals immobilization brought to the increase of acetylcholine turnover in BP and decrease in FP.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Гурин В. Н.* Холинергические механизмы регуляции обменных процессов, Минск, Беларусь, 1975.
2. *Денисенко П. П.* Роль холинореактивных систем в регуляторных процессах, М., Медицина, 1980.
3. *Фурдуй Ф. И.* Физиологические механизмы стресса и адаптации при остром действии стресс-факторов, Кишинев, Штиинца, 1986.
4. *Хайларлиу С. Х.*—В кн.: Механизмы развития стресса, с. 99—113, Кишинев, Штиинца, 1987.
5. *Janowsky D. S., Risch S. C.* *Integr. Psych.*, v. 3, № 1, p. 3—16, 1985.
6. *Эмирбеков Э. Э., Кличохов Н. К.* *Укр. биохим. журн.*, т. 58, № 6, с. 63—66, 1986.
7. *Fatranska M., Budai D., Kvetnansky R., Kasa P.*—In: *Mol. Basis of Neur. Func.*, p. 129, Prague, 1986.
8. *Ford D. M., Hellon R. F., Luff R. H.* *J. Physiol.*, v. 231, p. 34—35, 1973.
9. *Gabriel N. N., Soliman K. F. A.* *Horm. Res.*, v. 17, p. 43—48, 1983.
10. *Петрова Н. В., Фатранска М., Кветнанский Р., Белова Т. И., Каштанов С. Н.* *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, т. 96, № 8, с. 28—30, 1983.
11. *Fonnum F. J.* *Neurochem.*, v. 24, p. 407—409, 1975.
12. *Karnovsky M., Roots L. J.* *Histochem. Cytochem.*, v. 12, p. 219—222, 1964.
13. *Лапша В. И., Челубеев В. Е.* *Докл. АН БССР*, т. 27, № 1, с. 82—85, 1983.

Поступила 6. V 1988.

О НЕКОТОРЫХ ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ
МНОЖЕСТВЕННЫХ ФОРМ НЕЙРОГОРМОНА «С»СРАПИОНЯН Р. М., СААКЯН С. А., КАРАПЕТЯН Р. О., СААКЯН Ф. М.,
МАРКИН В. А., ОДАБАШЯН А. Б., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

В предыдущей работе [1] было показано наличие множественных (4-х) форм кардиотропного нейрого르몬а «С» (иС), выделенных из гипоталамической области мозга. Исследование ряда физико-химических, биохимических и функциональных свойств, свидетельствующих о сходстве между этими соединениями, позволило заключить, что название нейрого르몬 «С» является собирательным понятием. Однако к вопросу классификации этих соединений, по-видимому, можно вернуться после выяснения их химической структуры.

В связи с вышесказанным, нам представлялось целесообразным проведение сравнительного изучения первичных характеристик (аминокислотный и углеводный состав) всех форм гипоталамического иС с целью выяснения структурных различий между ними.

Кардиоактивные соединения выделяли из уксуснокислого экстракта обезжиренной спирт-хлороформной смесью гипоталамической ткани по методу, описанному ранее [2]. Для сравнения были взяты препараты указанных соединений, диссоциированных от своих белковых носителей [3]. Гель-фильтрацию через сефадексы G-25 и модифицированный G-10, ИОХ на ДЭАЭ-ц проводили по схеме, описанной ранее [1]. ВЭЖХ проводили на аналитических колонках (0,5×30 см) с Ultrasphere ODS C₁₈ (Alltech) в смеси метанол-вода (3:1).

Аминокислотный состав определяли после гидролиза препаратов иС в стандартных условиях (5.7 НСl, 24 ч, 110°) в автоматическом анализаторе «Биотроник», модель LC 5000 (ФРГ). Моносахаридный состав определяли после метанолиза и *ре-N*-ацетилирования и превращения образующихся при гидролизе моносахаридов в *N*-(4-метилкумарин-7-ил) гликамины (АМК-сахара) по методу Хорлина и соавт. [4]. Дальнейшее разделение и количественное определение АМК-сахаров проводили на жидкостном хроматографе «Du Pont 8800» (Франция), снабженном точным флуориметром FS-970 («Shoefell», ФРГ) и интегратором Du Pont

SF 4100, на колонках (4,6×250 мм), Ultrasphere ODS («Alltech»), в системе 17,5%-ного водного этанола, содержащем 0,1%-ную трифторуксусную кислоту. Использована защитная колонка (4,6×50 мм), заполненная Silasorb Юмш ODS. Соединения идентифицировали по способности ингибировать активность ФДЭ сАМР, определяемой по методу Pochl [5], модифицированному применением радионуклидного микрометода [6, 7]. Биологическое тестирование проводили в условиях *in situ* на кошках под уретановым наркозом по методу Mogawitz [8].

Используя очистку по схеме, описанной ранее [1], удалось выделить 4 коронарорасширяющих иС-подобных и одно коронаросуживающее соединение, условно обозначенные по параметрам гель-фильтрации иС_{7a}, иС_{10a}, иС_{7b}, иС_{10b} и иС_{7a'}, соответственно. Сравнение некоторых биохимических характеристик, в частности способности ингибировать ФДЭ сАМР, показало, что они отличаются лишь степенью воздействия в одном и том же направлении—ингибируют в основном кальмодулинзависимую ФДЭ сАМР мозга. Подобная аналогия прослеживается и в отношении изменения коронарного оттока у большинства исследуемых соединений. Противоположное действие оказывает лишь иС_{7a}, суживающий в значительной степени коронарные сосуды. Для всех соединений характерно низкое значение рI; они способны сохранять положительный заряд даже при низких значениях рН [3]. Другим отличительным свойством для всех форм иС является отсутствие характерного для пептидных соединений поглощения в области 210 нм.

Таблица 1

Аминокислотный состав множественных форм нейрогормона «С»
(в нмоль/мкг пептида)

Аминокислоты	иС _{7a}	иС _{10a}	иС _{7b}	иС _{10b}
Asp	1,40 (1)	1,20 (1)	1,40 (1)	1,40 (1)
Thr	0,80 (1)	0,80 (1)	0,80 (1)	0,86 (1)
Ser	3,60 (4)	2,48 (2)	2,35 (2)	3,40 (3)
Glu	3,20 (3)	1,12 (1)	1,45 (1)	2,80 (3)
Gly	3,80 (4)	1,25 (1)	1,60 (2)	3,60 (3)
Ala	1,40 (1)	0,68 (1)	1,50 (1)	1,40 (1)
Val	0,48 (1)	0,62 (1)	0,30 (0)	0,47 (0)
Heu	0,34 (0)	0,70 (1)	0,80 (1)	0
Leu	0,42 (0)	0,80 (1)	0,92 (1)	0
X	0	0,78	0	0
GaIN	0	0	0,48	0,48
GleN	0,65	0	0,67	0,78
His	3,20 (3)	0	1,20 (1)	2,3 (2)

Примечание. Met, Cys, Trp не определяли. Количество пептида определено по методу Lowry.

Как оказалось, по аминокислотному составу (табл. 1) изоформы очень близки и характеризуются высоким (40—77%) содержанием, как и их предшествующие молекулы [9], определенной группы полярных аминокислотных остатков Asp, Ser, Glu, Gly, Ala и в особенности двух из них—Ser и Gly (23—43%). Процент кислых аминокислотных остатков

не компенсируется основными аминокислотами, что и обуславливает, по-видимому, их быстрое анодальное мигрирование. Кроме того, во всех указанных соединениях обнаруживается значительное количество аминосугаров GalN и GlcN, свидетельствующих о том, что молекулы их гликолизированы. Сопоставляя полученные данные, можно заключить, что, поскольку особых отличий в аминокислотном составе различных иС-форм не было обнаружено, сделать какие-либо окончательные выводы о различии в пептидной компоненте не представляется возможным. Ни для одного из этих соединений не удалось определить N-концевой аминокислотный остаток с помощью дансилирования, что позволило предположить заблокирование аминогрупп в этих остатках определенными заместителями. Наличие углеводного компонента в некоторых из этих соединений (иС_{7a} и иС_{10a}) было установлено ранее данными масс-спектрального и ЯМР

Таблица 2

Моносахаридный состав кардиоактивных множественных форм нейрогормона «С»

Сахары	Кардиоактивные гликопептиды, пмоль/моль Man			
	иС _{7a}	иС _{10a}	иС _{7b}	иС _{10b}
Gal	266,8	266,8	75,5	273,8
Man	245,2	287,9	54,9	241,7
GlcNAc	69,02	68,5	0	93,2
Fuc	61,05	50,7	0	49,0
GalNAc	38,09	37,5	51,5	23,2

Примечание. В качестве стандарта использовали ManN.

анализа. Так например, при масс-спектроскопии двух коронарорасширяющих форм иС и суживающего «спутника» иС_{7a}—иС_{7a'}, хотя и были выявлены определенные отличия по интенсивности основных пиков, однако в целом пики с m/e 331, 211, 169, имеющиеся во всех соединениях, свидетельствовали об их гликозидной природе [10]. Интерпретация полученных ПМР-спектров нативных молекул всех форм иС подтвердила заключение о том, что исследуемые соединения являются гликопептидами, различающимися в основном по количественному соотношению сахарных остатков в углеводном компоненте. Применение этих методов при структурном анализе углеводных компонентов гликоконъюгатов из-за недостаточной их чувствительности (наимольный уровень) оказалось неприемлемым для наших конкретных задач. Использование же метода, определяющего флуориметрически АМК-производные сахаров [4], позволило получить, в частности, информацию о моносахаридном составе кардиоактивных гликопептидов (табл. 2). Полученные данные позволили соотнести кардиоактивные иС-формы к типу N-гликозидносвязанных, маннозобогатых гликопептидов. Можно было бы допустить также наличие О-цепей, связанных с остатками Ser, имея в виду достаточное количество Gal и GalNAc и высокое содержание Ser (29%). Впрочем, окон-

чательного вывода пока нет, так как выдвинутая гипотеза основывается только на одном косвенном и, по сути, формальном признаке—присутствии GalNAc. С другой стороны, за последние годы появились сведения об аналогичном факте (11), свидетельствующем о наличии GalNAc, заменяющего GlcNAc во «внутренней коре» N-гликана ряда гипофизарных гормонов (лютеотропина, фолликулотропина и тиреотропина). Проведенное сравнительное изучение перлициной характеристики множественных форм иС и выявленное сходство, в частности по аминокислотному составу, в некоторых случаях позволяет заключить, что эти формы произошли, по-видимому, от общего предшественника и подвергались в дальнейшем пост-трансляционной модификации. Безусловно, дальнейшие исследования, проводимые в этом направлении, представляются весьма важными, поскольку они сделают правомочным это допущение.

ON THE CERTAIN CHEMICAL PROPERTIES OF THE MULTIPLE FORMS OF NEUROHORMONE "C"

SRAPIONIAN R. M., SAAKIAN S. A., KARAPETIAN R. O., SAAKIAN F. M., MARKIN V. A., ODABASHIAN A. B., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, Armenian SSR Acad. Sci., Yerevan

Amino acid and monosaccharide composition of the multiple forms of hypothalamic neurohormone "C" has been investigated. The similarity of the forms by their amino acid composition has been revealed. The blocking of N-terminal amino acid residues of the all tested compounds has been established. The data obtained demonstrate that all the compounds being under investigation appertain to N-glycoside-bound, mannose-rich type of glycopeptides.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А., Срапионян Р. П., Карапетян Р. О., Абелян Ж. Г., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Абрамян С. С., Григорян А. А., Одабашян А. Б., Бочко Н. Ф. Нейрохимия, т. 5, с. 354—365, 1986.
2. Галоян А. А., Алексанян Р. А. Докл. АН АрмССР, т. 37, с. 157—160, 1963.
3. Срапионян Р. М., Джамбазян Т. А., Галоян А. А. Вспр. биохимии мозга, т. 6, с. 157—160, Ереван, Изд-во АН АрмССР, 1970.
4. Хорлин А. Я., Шиян С. Я., Маркин В. А., Нессонов В. В., Мирзоянова М. Н. Биоорг. химия, т. 12, с. 1203—1212, 1986.
5. Poch G., Kukowitz W. R. Life Sci., v. 10, p. 133—141, 1971.
6. Беритацивили Д. Р., Кафиани К. А. Вспр. мед. химии, т. 21, с. 322—329, 1975.
7. Галоян А. А., Гураци Б. Я., Полюсян М. А. Вспр. биохимии мозга, т. 11, с. 89—97. Изд-во АН АрмССР, Ереван, 1976.
8. Morawitz P. L., Zahn A. Deutsch. Klin. Med., v. 115, p. 364—397, 1914.
9. Срапионян Р. М., Саакян С. А., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 2, с. 263—271, 1983.
10. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Медведлев Ф. А. Докл. АН АрмССР, т. 66, с. 302—305, 1978.
11. Pursons T. F., Pierce J. G. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, Biol. Sci., v. 77, p. 7089—7093, 1980.

Поступила 2. II 1988



МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

УДК 57.083.5

ДВУСАЙТНЫЙ ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ
СПЕЦИФИЧЕСКОГО α_2 -ГЛОБУЛИНА МОЗГА
НА ОСНОВЕ КОЛОНОЧНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

ЧЕХОНИН В. П., ЦЕРБАКОВ В. М., МОРОЗОВ Г. В., МОРКОВКИН В. М.

ВНИИ общей и судебной психиатрии им. В. П. Сербского, Москва

Разработан колоночный вариант двусайтного иммуноферментного метода для определения α_2 -глобулина мозга (α_2 -ГМ) человека.

Оптимальную работу системы наблюдали при использовании конъюгата $F(ab)_2$ фрагментов антител к α_2 -ГМ с β -D-галактозидазой в количестве 130 Ед/л, а $F(ab)$ фрагментов антител с иммуноглобулином IgG кролика—в концентрации 40 мкг/мл.

Этот метод был использован для исследования проницаемости ГЭБ больных, находящихся в критическом состоянии, обусловленном психическими расстройствами.

Иммунохимическое изучение специфических антигенов мозга позволило ввести в лечебную практику способы дифференциальной диагностики и контроля за эффективностью лечения психических [1], неврологических [2], а также некоторых онкологических заболеваний [4, 5].

Среди иммунохимических методов центральное место в последние годы заняли иммуноферментный и радиоиммунный, каждый из которых имеет несколько вариантов и модификаций [3, 8], обладающих различными уровнями чувствительности.

В настоящей работе описан колоночный вариант двусайтного иммуноферментного метода [11] для определения специфического α_2 -ГМ [1], принцип которого представлен на рис. 1.

Антисыворотки к α_2 -ГМ получали иммунизацией овец очищенными препаратами этого антигена [1]. Антитела выделяли из моноспецифических антисывороток с помощью специфических иммуносорбентов на основе CNBr-сефарозы 4В и препарата α_2 -ГМ [10]. $F(ab)_2$ фрагменты антител к α_2 -ГМ выделяли обработкой антител пепсином [6], восстанавливали 2-меркаптоэтиламиноом и конъюгировали с β -D-галактозидазой (ЕС 32.1.23 из E. Coli, «Boeringer», ФРГ) при помощи N—N-о-фенилдималенисимиды («Sigma», США). $F(ab)$ фрагменты антител к α_2 -ГМ получали при обработке $F(ab)_2$ фрагментов 2-меркаптоэтиламиноом [6].

Конъюгаты $F(ab)$ фрагментов антител к α_2 -ГМ с IgG кролика.

10 мг препарата IgG кролика, выделенного высаливанием сульфатом аммония диализом и хроматографией на ДЭАЭ-52 целлюлозе («Whatman», Англия) [7], смешивали с 30 мг $F(ab)$ фрагментов антител овцы к α_2 -ГМ и к смеси прибавляли 15 мг 1-циклогексил-3-(2-морфолиноэтил) карбодимид мето-4-толуолсульфоната («Sevva», ФРГ), встряхивали в течение 12 ч и насаивали на колонку с сефадексом G-200 («Pharmacia», Швеция), уравновешенную 0,1 М натрий-фосфатным буфером, pH 7,4. При гель-хроматографии отбирали белковую фракцию с M_r 210 кД—иммунохимически именно она содержала конъюгат $F(ab)$ —IgG кролика.

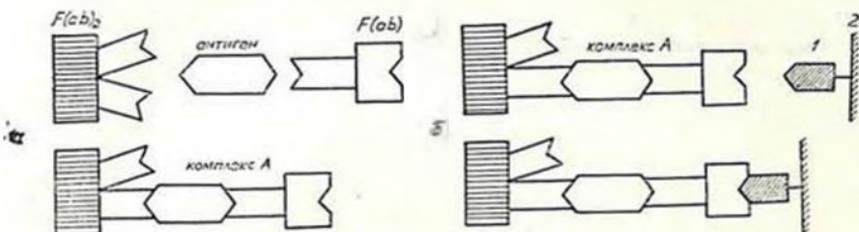


Рис. 1. Принципиальная схема двухсайтного иммуоферментного анализа. а—двухсайтно образование антиген-антительного комплекса (комплекса А): с одной стороны, за счет взаимодействия с антигеном конъюгата $F(ab)_2$ фрагментов овечьих антител с ферментом, а с другой—конъюгат $F(ab)$ фрагментов овечьих антител с IgG кролика; б—иммунохимическое взаимодействие комплекса А с антителами осы к IgG кролика (1), иммобилизованными на твердой фазе (2).

Иммобилизация анти IgG антител на CNBr-сефарозе 4В.

Антитела осы к IgG кролика получали на иммуносорбенте из соответствующей антисыворотки («Boeringwerke», ФРГ). Для иммобилизации смешивали 50 мг антител осы в 10 мл 0,1 М карбонатного буфера pH 9,0 с 10 мл CNBr-сефарозы 4В («Pharmacia», Швеция) и инкубировали на роторной мешалке в течение 12 ч при 4°. Блокаду активных групп CNBr-сефарозы проводили путем 2-часовой инкубации геля в 1 М растворе глицерина. Иммуносорбент с иммобилизованными антителами уравновешивали 0,1 М трис-HCl буфером, pH 8,0.

Стандартные сыворотки. Высокоочищенный препарат α_2 -ГМ разводили в сливной сыворотке крови человека с учетом ее свободного пассиважа через колонку с иммобилизованными антителами.

Процедура иммуноопределения: 50 μ л стандартной сыворотки, содержащей α_2 -ГМ различной концентрации или исследуемого образца биологической жидкости, смешивали с 500 μ л конъюгата антител к α_2 -ГМ с β -D-галактозидазой в рабочем буфере (0,1 М натрий-фосфатный буфер, содержащий 0,3 М хлорида натрия; 1 мМ хлорида марганца; 1 г бычьего

го сывороточного альбумина фирмы «Sigma», США: 1 г азид натрия, pH 7.4). Смесь инкубировали в течение 10 мин при 30°, после чего к ней прибавляли 100 μ л конъюгата овечьих F(ab) фрагментов антител к α_2 -ГМ с кроличьим IgG (40 мкг/мл в рабочем буфере) и инкубировали 30 мин при 30°.

500 μ л полученной смеси насаивали на колонку (4 \times 8 мм, воронкообразной верхушкой) при скорости потока 1 мл/мин, наполненную 0,1 мл CNBr сефарозы 4В, с иммобилизованными антителами осла к IgG кролика и уравновешенную рабочим буфером. После этого колонку дважды промывали натрий-фосфатным буфером 0,1 М, pH 7,4 (рабочим буфером) и насаивали на нее 0,25 мл о-нитрофенил β -D-галактозида (8,3 мМ), растворенного в рабочем буфере, и задерживали поток на 60 мин при 30° для полноценного протекания ферментной реакции. Тормозили протекающую реакцию промывкой колонки 1 мл 80 мМ карбоната лития.

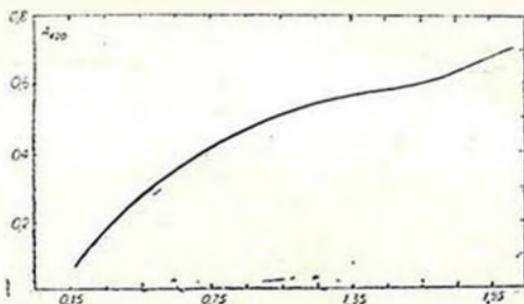


Рис. 2. Типичная стандартная калибровочная кривая для α_2 -ГМ. По оси абсцисс—концентрация α_2 -ГМ в нг/мл, по оси ординат—абсорбция при 420 нм

Абсорбцию элюата измеряли при 420 нм на спектрофотометре («Hitachi», Япония); в контрольную кювету добавляли о-нитрофенол.

Разработанный метод определения α_2 -ГМ позволил выявить антиген в интервале концентраций от 0,150 до 250,0 нг/мл. Типичная стандартная кривая для определения α_2 -ГМ, построенная на основании данных 25 экспериментов, показана на рис. 2. Статистический анализ среднего квадратичного отклонения точек, которое не превышает 1,0%, позволяет судить о надежности и хорошей воспроизводимости в работе описанной системы. Оптимальную работу системы наблюдали при использовании и конъюгатов F(ab)₂ фрагментов антител к α_2 -ГМ с ферментом в концентрации 140 ед./л, а конъюгата F(ab) фрагмента антител к α_2 -ГМ и IgG кролика— в концентрации 40 мкг/мл. Минимально обнаруживаемое количество α_2 -ГМ было равно 150 ± 8 нг/мл. Для сравнения необходимо сказать, что с помощью «сэндвич» варианта ELISA [9] нам удалось определить количество α_2 -ГМ, равное 800 пкг/мл.

Разработанная система была применена нами для иммунохимического поиска специфического α_2 -ГМ в сыворотке крови здоровых доноров (32 мужчины и 28 женщин), а также больных, находящихся в критическом состоянии, обусловленном соматическими (панкреатит, перитонит), а также психическими (фебрильная шизофрения, острая алкогольная энцефалопатия, тяжелая нейролепсия) заболеваниями. Результаты иммуноферментного определения α_2 М в сыворотке крови психически больных представлены в таблице. При иммуноферментном исследовании сыворотки крови доноров изучаемый антиген не был обнаружен.

Таблица

Результаты иммуноферментного изучения α_2 -ГМ в сыворотке крови больных, находящихся в критическом состоянии, обусловленном психическими и соматическими заболеваниями

Критические состояния, обусловленные:	Количество больных	Количество исследованных больных, содержащих в сыворотке крови α_2 -ГМ (нг/мл)					
		0,150—0,300	0,300—0,600	0,600—1,200	1,200—2,400	2,400—4,800	4,800—9,600
фебрильной шизофренией,	46	10	5	2	1	2	1
острой алкогольной энцефалопатией,	48	7	4	1	1	1	—
тяжелой нейролепсией,	47	12	4	1	—	—	—
острым панкреатитом,	23	—	—	—	—	—	—
перитонитом	30	—	—	—	—	—	—

Анализируя данные таблицы, можно отметить факт появления α_2 -ГМ в сыворотке крови больных, находящихся в критическом состоянии, обусловленном психическими расстройствами. Этот антиген обнаруживается в сыворотке крови больных фебрильной шизофренией (45% больных), острой алкогольной энцефалопатией (30% больных) и тяжелой нейролепсией (40% больных) в интервале концентраций от 9,6 до 0,15 нг/мл.

Для сравнения необходимо отметить, что обычный «сендвич» вариант [9] иммуноферментного анализа не обнаруживал появления низких концентраций α_2 -ГМ в сыворотке крови и не позволял маркировать подобные состояния.

Таким образом, применение относительно простого, легко воспроизводимого метода определения вискомолекулярных соединений (антигенов и антител), каким является двухсайтный иммуноферментный анализ на основе колоночной хроматографии, в практике критических состояний, обусловленных психическими расстройствами, не только позволяет осуществлять объективный контроль за проницаемостью ГЭБ, но, по-видимому, может открыть широкие перспективы в диагностике и наблюдении за эффективностью лечения подобных состояний.

DOUBLE-SITE IMMUNOENZYME ASSAY OF BRAIN SPECIFIC α -2-GLOBULIN ON THE BASIS OF THE COLUMN CHROMATOGRAPHY

CHEKHONIN V. P., SHCHERBAKOV V. M., MOROZOV G. V.,
MORKOVKIN V. M.

V. P. Serbiky All-Union Scientific Research Institute of General
and Forensic Psychiatry

The column version of double-site immunoenzyme assay for the determination of human brain α -2-globulin has been developed. The optimal functioning of the system has been observed when conjugates of F(ab)₂ fragments of antibodies to α ₂M and β -D-galactosidase (130 U/l), as well as conjugates of antibody F(ab) fragments and rabbit immunoglobulin IgG (40 μ g/ml) were used.

This method was applied for the investigation of hemato-encephalic barrier permeability in patients being in critical state caused by mental disorders.

ЛИТЕРАТУРА

1. Морозов Г. В., Морковкин В. М., Чехонин В. П., Кселецкая Э. Н.—В кн.: Проблемы неострой психиатрии. М., с. 110—112, 1985.
2. Морковкин В. М., Чехонин В. П., Колесников А. Н. Журн. невропатологии и психиатрии им. С. С. Корсакова, № 10, с. 1474—1476, 1986.
3. Chard T. An introduction to radioimmunoassay and related techniques, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1986.
4. Delpach B., Delpach A., Vigard N. N. Brit. J. Cancer, v. 37, p. 33, 1978.
5. Dittman L., Axelsen, N., Norgaard-Pedersen B. Brit. J. Cancer, v. 35, p. 135, 1977.
6. Kato K., Fukui H., Hamaguchi Y., Ishikawa E. Immunology, v. 116, p. 1554, 1976.
7. Kato K., Umeda Y., Suzuki F., Hayashi D., Kasaka A. J. Appl. Biochem., v. 1, p. 479, 1979.
8. Tijssen P. Practice and Theory of Enzyme immunoassays, Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1985.
9. Voller A., Bidwell D. E. Bull. World Health. Org., v. 53, p. 55, 1976.
10. Weir D. Handbook of Experimental Immunology, Oxford, 1978.
11. Yamamoto R., Kimura S., Mitsuura A., Fukuda Y., Hayakawa T., Kato K. J. Immunologic. Methods, v. 87, p. 197—201, 1986.

1...

Получена 12. XII 1987



К ВОПРОСУ О ВЕЗИКУЛЯРНОМ ПУЛЕ АМИНОКИСЛОТНЫХ НЕЙРОТРАНСМИТТЕРОВ

БУДАНЦЕВ А. Ю.

Институт биологической физики АН СССР. Пущино

В кратком обзоре приводятся данные о синаптических везикулах, накапливающих аминокислотные нейротрансмиттеры. Отмечается, что одним из факторов, затрудняющих исследование везикулярного накопления аминокислот в синаптических везикулах, являются методические трудности, связанные с прямым выделением фракций везикул, специфично депонирующих аминокислоты. В обзоре обсуждается возможность использования переживающих срезов мозга (в частности гиппокампа) для идентификации и изучения динамики и механизмов накопления аминокислот-нейротрансмиттеров в синаптических везикулах с комплексным применением методов электрофизиологии, электронной микроскопии и функциональной биохимии (в частности с применением суперфузионных методов).

При изучении молекулярных механизмов и систем регуляции синаптического процесса, протекающего с участием аминокислотных нейротрансмиттеров (глутамат, аспартат, ГАМК и др.), одна из важнейших задач заключается в изучении механизмов высвобождения указанных нейротрансмиттеров при деполяризации мембран нервных окончаний.

Для катехоламинов и индоламинов (дофамин, норадреналин, адреналин, серотонин) четко показано, что они накапливаются в пресинаптическом пространстве в специальных синаптических везикулах (СВ) [1—4]; считается, что они высвобождаются в синаптическую щель в основном путем экзоцитоза. Для АХ также показано наличие везикулярного пула в пресинаптическом пространстве [5], однако вопрос о механизме высвобождения «синаптически активного» АХ из пресинаптического окончания еще не решен (под «синаптически активным» понимается тот пул нейротрансмиттера, который высвобождается при деполяризации мембран нервных окончаний). В последние годы дискутируется вопрос о везикулярно-экзоцитозном механизме высвобождения и неэкзоцитозном, цитозольном высвобождении АХ [6, 7].

Изучение возможности везикулярного накопления синаптически активных аминокислот-нейротрансмиттеров (глутаминовая кислота, ГАМК, глицин и др.) с использованием стандартных биохимических методов выделения фракции СВ сопряжено с рядом трудностей [2, 8].

В 1972 году в статье Rossin [9] было высказано сомнение о возможности связывания нейротрансмиттеров-аминокислот, в том числе и глутамата с синаптическими везикулами. Однако уже в 1973 году De Belloche, Bradford [10] поставили вопрос о пересмотре такого представления и показали накопление целого ряда аминокислот в СВ, хотя при этом утверждали, что высвобождается скорее цитоплазматический, чем везикулярный пул аминокислот-нейротрансмиттеров (глутамат, аспартат, ГАМК и др.). В дальнейшем был получен ряд данных относительно везикулярного накопления нейротрансмиттеров-аминокислот на основе регистрации активного транспорта этих нейротрансмиттеров в СВ, выделенные из мозга: ГАМК [2], l-глутамата и других, аминокислот [8]. В ряде работ прямым биохимическим определением показано наличие аминокислотных нейротрансмиттеров в СВ [11—13], или их накопление в СВ после внутримозговой инъекции соответствующих аминокислот [14].

В результате детального исследования захвата глутамата СВ показано, что эти везикулы (диаметр—50 нм) очень чувствительны к механическим и химическим воздействиям [8]. Например, применение стеклянного гомогенизатора для перемешивания суспензии везикул приводит к уменьшению активности захвата глутамата везикулами на 60%. В целом процесс захвата глутамата СВ ничем в принципе не отличается от захвата других нейротрансмиттеров и является Ca^{2+} , Mg^{2+} и АТФ-зависимым механизмом [15], сопряженным с функционированием H^+ -насоса. Работа специфического переносчика «включается» при инициации Mg -АТФ-индуцированного активного транспорта H^+ внутрь СВ [16]. Однако может происходить и неспецифический захват глутамата в СВ, содержащие в норме другие нейротрансмиттеры. Это связано с тем, что пока не разработаны надежные способы получения фракции СВ из ткани мозга, специфических к захвату и депонированию какого-либо одного нейротрансмиттера, а результаты исследования захвата глутамата, приведенные выше, проводились на суммарных фракциях СВ, выделенных после «мягкой» гомогенизации.

Известна лишь одна работа, в которой при помощи иммуносорбции суммарной фракции СВ с кроличьей антисывороткой к нейроспецифическому белку-синапсину выделена фракция СВ, специфично накапливающая глутамат [17]. Выделенная «чистая» фракция СВ (диаметр везикул 35—40 нм) способна в присутствии Mg -АТФ захватывать только глутамат, а не другие аминокислотные нейротрансмиттеры (l- и d-аспартат, глутамин, ГАМК). Активный захват глутамата сопровождается (или

инициируется) гидролизом АТР и не происходит в присутствии негидролизуемого аналога АТР— β , γ -метилен-АТР.

Таким образом, можно отметить, что способы выделения СВ, накапливающих аминокислоты-нейротрансмиттеры синаптической передачи в мозгу высших животных еще далеко не совершенны, и полученные фракции представляют в основном интерес для изучения биохимических и биофизических свойств выделенных везикул. Вопрос же о наличии везикулярного пула аминокислот-нейротрансмиттеров в нервном окончании практически остается открытым, несмотря на описанные выше данные. В связи с этим необходимо совершенствование существующих способов биохимического анализа для доказательства наличия везикулярного пула аминокислотных нейротрансмиттеров или поиск и разработка новых подходов для решения этой задачи. Один из возможных путей для функционально-биохимического исследования везикулярного пула аминокислот-нейротрансмиттеров заключается в поиске и изучении СВ в синапсах идентифицированных нейронов, в которых роль нейротрансмиттеров выполняют аминокислоты. С этой точки зрения изучение глутаматсодержащих СВ можно проводить, например, в гигантских синапсах в поле CA_3 мшистых волокон зернистых нейронов зубчатой фации переживающих срезов гиппокампа. Этот объект позволяет проводить комплексные исследования механизмов и регуляции глутаматергической синаптической передачи с использованием методов электрофизиологии, электронной микроскопии и функциональной биохимии (в частности, с применением суперфузионных методов).

Глутамат—нейротрансмиттер в гигантских синапсах в поле CA_3 гиппокампа?

Прямых данных о химической природе нейротрансмиттера в гигантских синапсах мшистых волокон в литературе нет, хотя вопрос о нейротрансмиттерах цепочки анториальная кора—перфорирующий путь—зубчатая фация—мшистые волокна—пирамидные нейроны поля CA_2 —коллатерали Шаффера—пирамидные нейроны поля CA_1 являлся предметом многочисленных исследований.

В ряде работ показано, что перфорирующий путь к зубчатой фации заканчивается синапсами, в котором нейротрансмиттером являются аспартат и глутамат [18—26]. Недавно показано, что глутамат может быть нейротрансмиттером в синапсах, образованных коллатералью Шаффера [27—28] и эфферентными путями от гиппокампа к переднему мозгу и гипоталамусу [29]. В работе Crawford, Connors [30] биохимически показано (мозг кошки), что в поле CA_3 в 2.5 раза уровень глутамата выше, чем в поле CA_1 и соответственно приблизительно на столько же выше активность дегидрогеназы l-глутаминовой кислоты. В противоположность этому концентрации аспартата в поле CA_1 и CA_3 почти одинаковы. При локальной стимуляции срезов (мшистые волокна) наблюдается увеличение высвобождения глутамата в суперфузат, но при сти-

муляции энторинальной коры это высвобождение сильно увеличивается (почти в 2 раза) [30]. Эти данные могут косвенно свидетельствовать, что нейротрансмиттером в синапсах мшистых волокон на пирамидных нейронах поля CA_3 может быть глутамат (в меньшей мере аспартат). При аппликации глутаминовой кислоты на срезы гиппокампа наблюдается возбуждение пирамидных нейронов через дендриты [31]. Представляют интерес работы, выполненные с действием каннатовой кислоты на гиппокампальные нейроны. При инъекции каннатовой кислоты в гиппокампе наблюдается преимущественно разрушение пирамидных нейронов в поле CA_3-CA_4 [32]. Хотя в настоящее время механизм действия каннатовой кислоты до конца не выяснен и специфичность ее разрушительного действия на нейроны именно глутаматергической природы не доказана [33], тем не менее высокая чувствительность пирамидных нейронов поля CA_3-CA_4 к каннатовой кислоте, циклическому аналогу глутаминовой кислоты, заслуживает внимания. При аппликации каннатовой кислоты к срезам гиппокампа наблюдается деполяризация пирамидных клеток в поле CA_3 [34], которые также чувствительны к прямому микроионофоретическому подведению глутамата [35]. В нашей лаборатории Кузнецовым [36, 37] были модифицированы искусственные фосфолипидные мембраны (БЛМ) солюбилизатором синаптических окончаний мшистых волокон. Добавление к такой модифицированной БЛМ глутамата приводило к появлению дискретных скачков проводимости мембран величиной около 15 пОм, сопровождаемых изменением проницаемости для Na^+ , K^+ и Cl^- . Добавление к БЛМ диэтилового эфира глутаминовой кислоты (антагонист глутамата [38]) приводило к снижению на 50% проводимости, вызванной глутаматом. В результате этих экспериментов, изучения распределения цинка в гиппокампе и динамики изменения его концентрации при электрофизиологических стимуляциях было высказано предположение, что нейротрансмиттером в гигантских синапсах мшистых волокон может быть глутамат, находящийся в определенном динамическом комплексе с ионами цинка. При помощи иммуоцитохимического метода удалось прямо наблюдать везикулярное накопление глутамата и ГАМК в синапсах ЦНС млекопитающих, в частности глутамата в синаптических везикулах в гигантских синапсах мшистых волокон в поле CA_3 гиппокампа [39]. Однако при последующем ауторадиографическом анализе захвата L-глутамата, в области окончания мшистых волокон в поле CA_3 было показано небольшое число гранул серебра, что авторы связывают скорее с техническими причинами [40]. Кроме этого, на основе анализа данных [18] об отсутствии измененной содержания захвата и высвобождения L-глутамата в поле CA_3 после дегенерации гранулярных клеток высказывается предположение [40], что только в небольшой части поля CA_3 расположены гигантские синапсы мшистых волокон. Имеется, по крайней мере, одна работа, в которой показано, что в мшистых волокнах и гигантских синапсах зернистых клеток в поле CA_3 нейротрансмиттером не являются аминокислоты (глутамат или аспартат). Эти данные получены при аппликации антагонистов аминокислотных нейротрансмиттеров

(в случае глутамата—диэтиловый эфир глутаминовой кислоты) на переживающие срезы и регистрации ВПСР в поле CA_3 после стимуляции мшистых волокон [41].

Необходимо отметить, что в области str. lucidum поля CA_3 гистохимическими методами не обнаружены биогенные катехоламины, индоламины и активность АХЭ [42—46].

Таким образом, на основе приведенных данных можно сделать вывод, что имеющиеся к настоящему времени результаты могут свидетельствовать о том, что нейротрансмиттером в гигантских синапсах мшистых волокон в поле CA_3 гиппокампа является глутамат. В любом случае можно считать зернистые клетки зубчатой фасции гиппокампа идентифицируемыми нейронами, в нервных окончаниях которых функционирует возбуждающий нейротрансмиттер-аминокислота—глутамат.

Переживающие срезы гиппокампа—модель для изучения везикулярного пула глутамата в пресинаптическом пространстве

Переживающие срезы гиппокампа представляют удобный объект, позволяющий проводить комплексное прижизненное исследование синаптических процессов, в частности в области поля CA_3 (гигантские синапсы нейронов зубчатой фасции), с использованием методов электрофизиологии, электронной микроскопии и функциональной биохимии. Исследование ультраструктуры окончаний мшистых волокон в переживающих срезах гиппокампа показало, что наблюдается хорошая морфологическая сохранность срезов в течение длительного времени инкубации. При этом сохраняются электрофизиологические параметры синаптической передачи [47]. В связи с этим возникает вопрос: нельзя ли при определенной постановке экспериментов попытаться использовать переживающие срезы гиппокампа и комплексный электрофизиологически-электронномикроскопический и функционально-биохимический анализ гигантских синапсов в поле CA_3 для изучения возможности везикулярного накопления аминокислотных нейротрансмиттеров?

Приведем некоторые исследования, проведенные в нашей лаборатории В. В. Петуховым, Е. Н. Безгнойной, В. И. Поповым (часть результатов опубликована [48, 49]). Эксперименты проводили на крысах-самцах[®] линии Wislar массой 120—150 г. Переживающие срезы гиппокампа толщиной 300—400 мкм готовили на специальном резаке [50], помещали в среду Кребса-Рингера следующего состава (в мМ): $NaCl$ —124; KCl —5; $CaCl_2$ —2; $MgSO_4$ —2; $NaHCO_3$ —26; KH_2PO_4 —1,25; глюкоза—10 (газовая фаза $O_2:CO_2$ —95%:5%; рН 7,4). После преинкубации в течение 1,5 ч в яротке раствора Кребса-Рингера (200 мкл/мин) срезы переносили в экспериментальную проточную ячейку и с помощью вольфрамового микроэлектрода (диаметр кончика около 1 мкм) регистрировали спонтанную электрическую активность в пирамидном слое поля CA_3 . Срезы, обладающие такой активностью, то есть имеющие неритмические, одиночные или пачечные потенциалы с частотой 0,15—1 Гц, использовали в последующих 3 группах экспериментов.

В I-ой, контрольной серии опытов, проводили тестирующую стимуляцию зубчатой фасции одиночными импульсами с амплитудой 10—12 В и длительностью 0,1 мс и регистрацию ответов в области слоя пирамидных нейронов поля СА₁.

Во II-ой серии опытов после тестирующей стимуляции и регистрации ответов в поле СА₁ зубчатую фасцию подвергали тетанической стимуляции—частота 15—20 Гц, напряжение 10—12 В; время стимуляции—10—15 с. После такой стимуляции в поле СА₂ отмечалась посттетаническая потенция.

В III-ей серии опытов после контрольного тестирования через подвергались «истощающей» стимуляции импульсами амплитудой 10—12 В и частотой 30—50 Гц. «Истощение» считалось достигнутым, если в течение 10 мин после такой стимуляции ответы в поле СА₂ не восстанавливались. Такое состояние достигалось за 30—60 мин «истощающей» стимуляции. В дополнительной серии опытов было показано, что приблизительно через 60 мин после достижения состояния истощения и отключения «истощающей» стимуляции восстанавливалось число ответов в поле СА₂ до 80—90% от исходного уровня.

Во всех трех сериях опытов после электрофизиологических измерений срезы фиксировались для электронномикроскопического анализа, как указано в работе Реликов, Попов [49].

Для морфологического анализа отбирали хорошо выраженные профили синаптических окончаний, в которых были отчетливо видны СВ, активная зона с межщелевым материалом и постсинаптическая мембрана с постсинаптическим уплотнением. Во всех экспериментах определяли удельную плотность везикул (число везикул на $\mu\text{м}^2$ профиля синаптического контакта), строили гистограмму распределения площадей СВ и рассчитывали их среднюю площадь. Все площади измеряли планшметром ПП-2. Статистическую оценку результатов проводили по критерию Стьюдента.

На рис. 1 представлены синаптические профили из str. lucidum поля СА₂ срезов гиппокампа (контроль). Как видно, площади синаптических профилей плотно заполнена СВ, митохондриями и профилями шипиков, хорошо видны уплотнения активных зон. В пресинаптическом профиле СВ двух типов: большая часть везикулярных структур представлена мелкими везикулами округлой или слегка опальной формы, окруженными мембранами и имеющими «светлую» сердцевину. Меньшая часть везикул (практически одиночные везикулы в одном синаптическом профиле) содержит электронно-плотную сердцевину. Эти везикулы округлой формы, расположены беспорядочно в синаптическом профиле и приблизительно в два раза больше по диаметру, чем «светлые» мелкие везикулы. На рис. 2 представлены гистограммы размеров «светлых» везикул и везикул с электронно-плотной сердцевиной. Видно, что наибольшее количество «светлых» везикул имеет площадь в пределах 1000—2000 нм^2 (максимум 1200 нм^2 , что соответствует диаметру везикул, если принять их форму за окружность, равную 39 нм), а наибольшее число везикул с электрон-

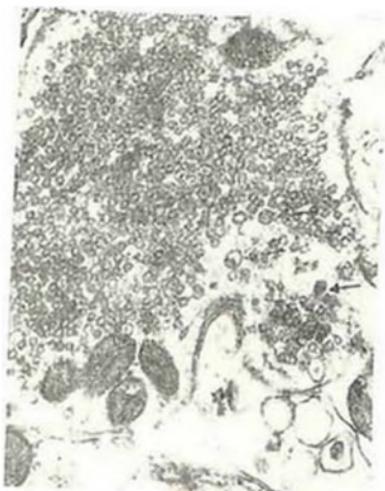


Рис. 1. Синаптические профили в str. lucidum поля CA₁ срезов гиппокампа. Контроль. Увеличение 30,000. Стрелками показаны синаптические везикулы с электроно-плотной сердцевиной



Рис. 3. Синаптические профили в str. lucidum поля CA₃ срезов гиппокампа. «Истощение». Увеличение 25,000. Стрелками показаны синаптические везикулы с электроно-плотной сердцевиной

но-плотной сердцевинной имеет площадь в пределах 2000—3000 нм² (максимум 300 нм²—диаметр 62 нм). Окаймленные везикулы в контрольных препаратах увидеть практически не удастся. Расположение СВ на площади пресинаптического профиля равномерное, не видно какой-либо особой локализации везикул, например, не наблюдается сосредоточение их около активных зон.

	Контроль n = 34	Посттетаническая потенциация n = 33	"Истощение" n = 61	"Восстановление" n = 67
Число везикул на 1 мкм ² площади син- аптического профиля	256 ± 16,0 (100%)	232 ± 16,0 (90,6%)	171 ± 8,0 (66,8%)	227 ± 12,0 (89,7%)

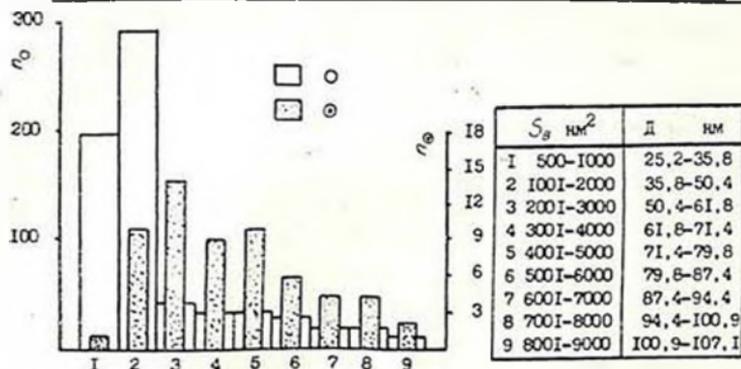


Рис. 2. Гистограмма размеров синаптических везикул (агранулярные — \square , гранулярные — \circ). S_v —площадь везикул, D —диаметр СВ. Вверху—изменение числа везикул на 1 мкм² синаптических профилей при различных функциональных состояниях переживающих срезов гиппокампа

При посттетанической потенциации количество «светлых» везикул заметно уменьшается, они становятся несколько сморщенными, окружающие их мембраны неравномерно электронно-плотными, хотя размеры везикул не изменяются. Меньшие изменения претерпевают везикулы с плотной сердцевинной. Необходимо отметить, что за поведением этого пула везикул, также как за «одетыми» везикулами, следить очень трудно из-за их небольшого количества. Изменение общей локализации везикул по площади синаптического профиля (по сравнению с контролем) не наблюдается.

В состоянии «истощения» (рис. 3) количество «светлых» везикул резко уменьшается. Оставшиеся везикулы имеют приблизительно такую же морфологию и распределение по площади синаптического профиля, как и в состоянии «посттетанической потенциации».

Таким образом, в гигантских синапсах мышечных волокон в поле СА₃ гиппокампа, согласно нашим данным, имеются СВ двух типов: мелкие со «светлой» сердцевинной (агранулярные) и крупные с электронно-плотной сердцевинной (гранулярные). После электрической стимуляции

зернистых клеток зубчатой фасции наблюдается уменьшение популяции мелких агранулярных везикул в гигантских синапсах в поле CA_3 гиппокампа и при блокировании синаптической передачи в случае «истощающей» стимуляции в гигантских синапсах сохранялось 60% указанных везикул.

Как было показано выше, в гигантских синапсах мшистых волокон в поле CA_3 гиппокампа в качестве нейротрансмиттера функционирует глутамат. В связи с этим можно предположить, что глутамат в этих синапсах содержится в синаптических агранулярных везикулах диаметром 40 нм, причем «синаптически активный» нейротрансмиттер локализован в 40% всей популяции указанных СВ. Размеры СВ в наших наблюдениях практически аналогичны результатам электронно-микроскопических исследований синаптических везикул в глутаматергических возбуждающих синапсах на соматических мышцах у членистоногих ($44,8 \pm 2$ нм) [51] и СВ, накапливающих глутамат, выделенных из мозга быка при помощи иммуносорбции с антисывороткой к синапсину [17].

Вопрос о функциональном значении крупных гранулярных везикул остается открытым. Как указывалось выше, в слое пирамидных нейронов поля CA_3 биогенных моноаминов и АХ не обнаружено. По-видимому, этот тип везикул не связан с цинксодержащими структурами, выделяемыми в гигантских синапсах при гистохимической реакции Тимма [37]. В последние годы в мшистых волокнах иммуногистохимически обнаружен энкефалин [52—54], хотя наибольшее количество иммунореактивных структур обнаружено в тонких волокнах, локализованных в зоне под слоем пирамидных нейронов в поле CA_3 , то есть пока нет данных о локализации энкефалина непосредственно в гигантских синапсах мшистых волокон. Из-за небольшого количества крупных гранулярных везикул в рассматриваемых синапсах невозможно точно определить их поведение при истощающей стимуляции, хотя можно отметить, что их количество в изученных синапсах в состоянии «истощения» уменьшается.

На основе только электронно-микроскопических данных практически невозможно установить какой механизм высвобождения нейротрансмиттера действует в рассматриваемых синапсах: экзоцитозный или неэкзоцитозный, хотя в ряде случаев наблюдаются типичные для экзоцитоза омегаподобные профили, отражающие взаимодействие пресинаптической мембраны и мембраны СВ. Необходимо отметить, что, если все приведенные утверждения справедливы, гигантские синапсы мшистых волокон гиппокампа при изучении на переживающих срезах являются перспективной модельной системой для изучения везикулярного накопления (и высвобождения) глутамата в синапсах с использованием сочетания биохимического анализа (суперфузионные методы) с фармакологическими, электрофизиологическими и электронно-микроскопическими методами [55].

В обзоре Dingleidine приводятся данные о доказательствах глутамат-аспаратной природы нейротрансмиттеров в синапсах, образованных коллатеральными Шаффера в str. radiatum поля CA_1 гиппокампа и высказывается сомнение относительно того, что в гигантских синапсах мшистых

волокон нейротрансмиттерами являются глутамат или аспарат [56]. В связи с этим на срезах гиппокампа анализ везикулярного пула накопления аминокислотных возбуждающих нейротрансмиттеров с использованием нашего подхода можно проводить не только на гигантских синапсах мелких волокон в поле CA_3 гиппокампа, но и в поле CA_1 в зоне окончания коллатералей Шаффера.

ON THE VESICULAR POOL OF NEUROTRANSMITTER AMINO ACIDS

BUDANTSEV A. Yu.

Institute of Biological Physics, USSR Acad. Sci., Pushino, Moscow Region, USSR

The data about synaptic vesicles that accumulate neurotransmitter amino acids are reviewed. It has been noted that methodological difficulties connected with the direct extraction of vesicles fractions specifically depositing aminoacids were among the factors impeding the studies of neurotransmitter amino acids accumulation in vesicles. The possibility to use surviving brain slices (in particular, that of hippocampus) for the identification and investigation of the dynamics and mechanisms of neurotransmitter amino acids accumulation in synaptic vesicles with the combined application of electrophysiology, electron microscopy and functional biochemistry techniques (specifically superfusing methods) are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Philippu A., Beyer J. Naunyn-Schmeidebergs Arch. exp. Path. Pharmac., v. 278 p. 387-402, 1973.
2. Philippu A., Matthaei H. Naunyn-Schmeidebergs Arch. exp. Path. Pharmac., v. 287, p. 191-204, 1975.
3. Slotkin T. A., Salvaggio M., Lan C., Kirksey D. F. Life Sci., v. 22, p. 823-830, 1978.
4. Blanchet B. K., Takimoto G. S. Life Sci., v. 34(7), p. 607-615, 1981.
5. Тучек С. Синтез ацетилхолина в нейронах, М., Мир, 1981.
6. Giompres P. E., Zimmermann H., Whittaker V. P.—In: Ontogenesis and Functional mechanisms of peripheral synapses (ed. J. Taxi). INSEBM Symposium, № 13, p. 91-98, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1980.
7. Dunant Y., Corthay J., Eder L., Loettl F.—In: Ontogenesis and Functional mechanisms of peripheral synapses (ed. J. Taxi). INSEBM Symposium, № 13, p. 99-108, Elsevier/North-Holland Biomed. Press, Amsterdam, 1980.
8. Karpainen A., Lahdesmaki P. Cell and Mol. Biol., v. 25, № 3, p. 195-202, 1979.
9. Rossin D. K. J. Neurochem., v. 19, p. 139-148, 1972.
10. De Belloroche J. S., Bradford H. F. J. Neurochem., v. 21, p. 441-451, 1973.
11. Kurtyama K., Roberts E., Kakefuda T. Brain Res., v. 8, 132-152, 1968.
12. Lahdesmaki P., Karpainen A., Saarni H., Winter R. Brain Res., v. 138, p. 295-308, 1977.

13. Zisapel N., Zurgil N. *Life Sci.*, v. 23, p. 231—236, 1978.
14. Karppinen A., Kumpulainen E., Lahdesmaki P. *Acta physiol.-scand.*, v. 105, № 2, p. 156—162, 1979.
15. Maito S., Ueda T. *J. Neurochem.*, v. 44, p. 99—109, 1985.
16. Глебов Р. Н., Мельник В. И., Титов С. Ю. *Биохимия*, т. 52, № 11, с. 1818—1828, 1987.
17. Naito S., Ueda T. *J. Biol. Chem.*, v. 258, p. 696—699, 1983.
18. Nadler J. V., Vaca K. W., White W. F., Lynch G. S., Cotman C. W. *Nature*, v. 260, p. 538—540, 1976.
19. Nadler J. V., White W. F., Vaca K. W., Redburn D. A., Cotman C. W. *J. Neurochemistry*, v. 29, p. 279—290, 1977.
20. Nadler J. V., Smith E. M. *Neurosci. Lett.*, v. 25, № 3, p. 275—280, 1981.
21. Segal M. *Brit. J. Pharmacol.*, v. 58, № 3, p. 341—345, 1976.
22. White W. F., Nadler J. V., Hamberger A., Cotman C. W., Cummins J. T. *Nature*, v. 270, p. 356—357, 1977.
23. Sandoval M. E., Horch P., Cotman C. W. *Brain Res.*, v. 142, p. 285—299, 1978.
24. Hicks T. P., McLennan H. *Can. J. Physiol. and Pharmacol.*, v. 57, № 9, p. 973—979, 1979.
25. Cotman C. W., Nadler J. V.—In: *Glutamate: Transmitter in the central nervous system* (eds. Roberts P. J., Storm-Mathisen J., Johnston G. A. R.), Wiley, Sons, Chichester, 1981.
26. Di Lamo A., Schmidt R. W., Meek J. L. *Brain Res.*, v. 207, p. 476—480, 1981.
27. Baudry M., Oliver M. *Life Sci.*, v. 27, № 4, p. 325—330, 1980.
28. Van Harreveld A., Strumwasser F. *Neuroscience*, v. 6, № 12, p. 2495—2503, 1981.
29. Walaas I., Fonnum F. *Neuroscience*, v. 5, № 10, p. 1691—1698, 1983.
30. Crawford J. L., Connor J. D. *Nature*, v. 244, p. 442—443, 1973.
31. Dudar J. D. *Neuropharmacology*, v. 13, p. 1083—1089, 1974.
32. Nadler J. V., Evenson D. A., Cuthbertson G. J. *Neuroscience*, v. 6, № 12, p. 2505—2517, 1981.
33. Cogle J. T. *Trends Neurosci.*, v. 1, № 2, p. 132—135, 1978.
34. Robinson J. H., Dedwyler S. A. *Brain Res.*, v. 221, № 1, p. 117—127, 1981.
35. Biscoe T. J., Stranghak D. W., *J. Physiol.*, v. 183, p. 341—350, 1966.
36. Кузнецов В. И., Мошленский Д. Н. *Studia biophysica (Berlin)* Bd. 49, № 1, S. 61—66, 1975.
37. Кузнецов В. И.—В сб. *Нейрохимия и физиология синаптических процессов* (под ред. А. Ю. Буданцева), с. 26—47, Пушкино, 1976.
38. Lunt G. G., Stefani E., De Robertis E. J. *Neurochem.*, v. 18, p. 1545—1551, 1971.
39. Storm-Mathisen J., Leknes A. K., Bore A. T., Vaaland J. L., Edminson P., Hang F.—M. S., Ottersen O. P. *Nature*, v. 301, № 5900, p. 517—520, 1983.
40. Taxt T., Storm-Mathisen J. *Neuroscience*, v. 14, № 1, p. 79—100, 1984.
41. White W. F., Nadler J. V., Cotman C. W. *Brain Res.*, v. 164, p. 177—194, 1979.
42. Pohle N., Matthies H. *Acta biol. et Med. germ.*, v. 25, p. 447—455, 1970.
43. Moore K. J., Halaris A. E. *J. Comp. Neurol.*, v. 164, p. 171—184, 1975.
44. Буданцев А. Ю. *Моноэнергетические системы мозга*, М., Наука, 1976.
45. Azmatia E., Segal M. J. *Comp. Neurol.*, v. 179, p. 641—648, 1978.
46. Valdes F., Fanelli R. J., McNamara J. O. *Life Sci.*, v. 29, p. 1895—1900, 1981.
47. Frotscher M., Miggeld U., Nitsch C. *Exp. Brain Res.*, v. 41, p. 247—255, 1981.
48. Попов В. И., Петухов В. В. *Докл. АН СССР*, т. 265, с. 1005—1009, 1982.
49. Petukhov V. V., Popov V. I. *Neuroscience*, v. 18, № 4, p. 823—835, 1986.
50. Буданцев А. Ю. *Авт. свид. № 1141303, Бюлл. изобр.*, № 7, 128, 1985.
51. Sherman R. G., Atwood H. L. *J. Gen. Physiol.*, v. 59, p. 586—615, 1972.
52. Fitzpatrick D., Johnson R. P. *Neuroscience*, v. 6, № 12, p. 2485—2498, 1981.

53. Gall C., Brecha N., Karten H. J., Chang D. J. *Comp. Neurol.* v. 198, p. 335—350, 1981.
54. Stenigard-Pedersen K., Fredens K., Larsson L. I. *Brain Res.* v. 212, № 1, p. 290—233, 1981.
55. Буданцев А. Ю. Микротом МНТ-84—срезы лативной ткани—прижизненные исследования на молекулярно-клеточном уровне. Информационный материал. Изд. ОНТИ НЦБИ АН СССР, г. Пушкино, 1985.
56. Dingledine R. In: *Brain Slices* (ed. R. Dingledine), p. 87—112, Plenum Press, New York, London, 1984.

Поступила 12. IV 1988



УДК 577.112.7.577.171.6:577.322.23

РАЗВИТИЕ ВЗГЛЯДОВ НА ПРИРОДУ И ФУНКЦИИ
ЭНДОГЕННЫХ ВЫСОКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ НОСИТЕЛЕЙ
РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ

ДАНИЛОВСКИЙ М. А.

НИИ экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

На примерах инсулина, гастрина, холецистокинина, пептидных регуляторов клеточной пролиферации, факторов позной асимметрии, вазопрессина, окситоцина и вещества Р рассматривается взаимодействие этих регуляторных пептидов с эндогенными высокомолекулярными носителями. Обсуждаются вопросы химической и биологической природы эндогенных носителей и их роль в качестве депонаторов, протекторов, модуляторов активности, антагонистов и переносчиков к клеткам-мишеням регуляторных пептидов.

Несмотря на огромный экспериментальный материал, накопленный за последнее десятилетие о биологических эффектах, вызываемых веществами пептидной природы с величиной M_r от нескольких сотен до нескольких тысяч Д, которые условно называют регуляторными пептидами (РП), они продолжают оставаться объектом пристального изучения биологов различных специальностей. В настоящее время внимание исследователей переместилось от вновь открываемых РП или новых свойств уже известных РП в сторону изучения механизмов их действия, обуславливающих их необычные свойства. Не останавливаясь на перечислении свойств конкретных РП, поскольку на эту тему ежегодно публикуется ряд обзоров и монографий, систематизирующих подобные сведения, специфические особенности в проявлении действия РП можно обобщить следующим образом: а) способность одной и той же полипептидной структуры вызывать различные биологические эффекты—полифункциональность [1, 2, 3]; б) способность вызывать определенные биологические эффекты в определенном дозовом диапазоне, вне которого наблюдаемый эффект исчезает и/или проявляется новое биологическое свойство РП: своеобразная эффект-дозовая зависимость [3—5]; в) способность проявлять свое действие через промежутки времени, несомненно большие времени жизни *in vivo*—отсроченные эффекты [6, 7]; г) способность проявлять свое

действие на организм, находящийся в патологическом состоянии, и не проявлять свое действие на интактный организм—модуляторное действие [1, 8, 9].

Для объяснения вышеперечисленных свойств РП привлекаются различные гипотезы о молекулярных механизмах действия РП:

1) процессинг РП *in vivo* и обуславливание биологических эффектов продуктами протеолиза РП [10—12]; 2) наличие популяций рецепторов в клетках-мишенях, имеющих различное сродство к данному типу РП [13, 14]; 3) различная доступность рецепторов РП на клетках-мишенях различных органов и, как следствие, зависимость эффектов от способа введения [13]; 4) способность РП вызывать экспрессию генома [15]; 5) особенности химического состава РП, обуславливающие высокую реакционную способность: большая подвижность молекулы в целом и ее частей, наличие избыточного положительного заряда и относительно высокого содержания высокогидрофобных аминокислот [16].

К настоящему времени получены экспериментальные доказательства, подтверждающие реальное существование всех этих механизмов. Вместе с тем, имеется небольшая группа экспериментальных фактов, позволяющих вскрыть механизм, принципиально отличный от всех вышеперечисленных, участвующий в обеспечении необычных свойств РП, включающий взаимодействие РП *in vivo* с эндогенным высокомолекулярным полимером и образование комплекса «РП-носитель». Взаимодействия такого типа могут оказывать существенное влияние на дальнейшую судьбу РП: активировать и инактивировать его, способствовать взаимодействию с клетками-мишенями, предохранять от протеаз и т. д.

Рассмотрим для иллюстрации этого механизма данные, полученные при изучении таких РП, как инсулин, гастрин, холецистокинин, пептидные регуляторы клеточной пролиферации, факторы поздней асимметрии, вазопрессин, окситоцин и вещество Р.

Инсулин. Наличие двух полипептидных цепей не допускает формально отнести инсулин к классу РП, однако малая величина M_r и наличие такого важного свойства, как полифункциональность (регуляция углеводного обмена, стимуляция пролиферации клеток в культурах, участие в регуляции нейрональной активности [5, 17]), позволяют рассматривать инсулин как переходную форму между белком и РП. В данном обзоре пример инсулина тем более значим, поскольку для инсулина были впервые найдены высокомолекулярные белковые модуляторы активности. Так, в 60-х годах появились сообщения, указывающие на существование особой формы инсулина—связанного инсулина [18—20], обладающей свойством тканеспецифичности. Связанная форма инсулина вызывала *in vitro* поглощение глюкозы только у жировой ткани, в отличие от свободного инсулина, стимулирующего поглощение глюкозы как жировой, так и мышечной тканью. Связанная форма инсулина по величине M_r превосходила свободный инсулин примерно в 10 раз, локализовалась на электрофореграммах в области трансферрина и орозомукоида: голодание или глюкозная нагрузка приводили к исчезновению активности инсу-

лина из области орозомукоида, как полагают авторы, за счет перехода инсулина из связанной формы в свободную [21]. Активность инсулина, связанного с трансферрином, не менялась. Был сделан вывод, что комплекс инсулина с орозомукоидом обеспечивает депонирование инсулина с целью быстрой и адекватной перестройки метаболизма при изменениях физиологического состояния организма. Трансферрин же, образующий комплекс с инсулином, определяет сродство инсулина именно к жировой ткани [21—23]. Следует особо отметить, что инсулин, находящийся в комплексе, не реагировал с антисывороткой против кристаллического инсулина.

Представленные данные указывают на то, что активность РП, величина его пула в крови и тканеспецифичность зависят от эндогенных высокомолекулярных веществ белковой природы.

Гастрин и холецистокинин. В настоящее время гастрин и холецистокинин можно лишь условно назвать пептидами пищеварительной системы, так как они обнаружены в ЦНС, и воздействие этих РП на ЦНС считается общеизвестным [17]. В Институте физиологии им. Павлова АН СССР был проведен большой цикл работ по изучению белков сыворотки крови, способных взаимодействовать с гастрином и формировать с ним комплексы различной степени устойчивости [24—28]. Эти белки по своей электрофоретической подвижности соответствовали фракциям преальбуминов, альбуминов, α - и γ -глобулинов (величина M_r их варьировала от 10 до 300 кД). Последующие исследования показали, что в состав этих белков входит альбумин, церуллоплазмин и иммуноглобулин G. Показано, что в модельных условиях 1 моль альбумина способен связать до 19 моль пентагастрина, и образование комплекса идет через С-концевой тетрапептид. Комплексообразование гастрина с церуллоплазмином приводит к снижению ферментативной активности церуллоплазмина на 18%. Иммуноглобулин, связывающий гастрин и получивший название гастроглобина, был найден не только в сыворотке крови, но и в поджелудочном соке собак. Гастроглобин обладал способностью подавлять желудочную секрецию при внутривенном введении, стимулированную предварительным введением гастрина. На основании проведенных исследований была выдвинута интересная гипотеза, объясняющая способность гастрина и холецистокинина влиять как на желудочную, так и на панкреатическую секрецию, и зависимость направленности этих эффектов от количества введенного гормона [29, 30]: вследствие идентичности С-концевого тетрапептида у гастрина и холецистокинина альбумин сыворотки крови является носителем для обоих этих гормонов. Введение в кровь гастрина в определенных дозах может приводить к вытеснению холецистокинина из альбумина и тем самым стимулировать панкреатическую секрецию. Подобный механизм может лежать и в основе стимуляции желудочной секреции холецистокинином [32].

Приведенные данные указывают на то, что различные РП могут конкурировать за места связывания с одним и тем же белком сыворотки крови и могут значительно влиять на активность ферментов крови, а

связывание РП высокомолекулярным белком *in vivo* может приводить к утрате эффектов, вызванных РП.

Пептидные стимуляторы клеточной пролиферации. В настоящее время число известных пептидных стимуляторов клеточной пролиферации исчисляется несколькими десятками [5]. Практически все они существуют *in vivo* в виде комплексов с белками с величиной M_r 30—150 кД, причем, как это следует из последующих, хоть и немногочисленных примеров, роль этих белков неизмеримо сложнее, чем роль простых носителей.

В сыворотке крови обнаружены несколько белков, образующих комплекс с инсулиноподобным фактором роста (ИФР) с M_r 7.0 кД, что приводит к появлению в сыворотке трех форм высокомолекулярных комплексов, содержащих ИФР. Комплексы эти имеют различные физико-химические и биологические свойства: биологически активный комплекс, не диссоциирующий в кислом рН; биологически не активный комплекс, необратимо диссоциирующий в кислом рН на собственно ИФР и белок-носитель; биологически активный комплекс, диссоциирующий в кислом рН и реассоциирующий при изменении рН в нейтральную сторону без потери активности [32].

Для эпидермального ростового фактора (ЭРФ) с M_r 6 кД из подчелюстных желез мыши выделен белок-носитель со свойствами протеазы (M_r 29 кД). Комплекс ЭРФ с носителем примерно в два раза, по сравнению с такой же концентрацией ЭРФ, усиливает синтез ДНК в культуре человеческих фибробластов [33]. Механизм такого потенцирующего действия состоит в том, что именно носитель способствует связыванию комплекса ЭРФ-носитель со специфическими рецепторами на мембране фибробластов и проникновению ЭРФ в клетку [34].

Мы уже упоминали, что связанная форма инсулина не реагирует с антисывороткой против кристаллического инсулина. Для некоторых соматомединов получены сходные данные. Отмечено, что для соматомедина (M_r 6 кД) комплексообразование с высокомолекулярным белком сыворотки (M_r 140 кД) существенно искажает результаты радионимнологического анализа из-за затруднения доступности молекулы соматомедина к антителам [35], а подкисление сыворотки делает соматомедины более доступными для антител, вероятно, за счет диссоциации комплекса соматомедин-носитель [36].

Стимуляторы клеточной пролиферации не обладают таким широким спектром физиологического действия, как другие РП, однако переход к другим тест-системам, несомненно, выявит их новые свойства, что хорошо подтверждается примером упомянутого выше инсулина. Поэтому должны быть приняты во внимание особенности их взаимодействия с эндогенными высокомолекулярными белками: высокомолекулярные белки оказывают на РП активирующее и инактивирующее действие и способствуют проникновению РП в клетки-мишени.

Пептидные ингибиторы клеточной пролиферации. По своей химической природе ингибиторы клеточной пролиферации—кейлоны являются

веществами пептидной или гликопептидной природы. Что касается величины M_r , то даже для одного типа кейлонов в работах разных авторов она варьирует на один-два порядка [37]. Однако анализ литературных данных позволяет предположить, что широкая вариабельность значений M_r находится в прямой зависимости от применяемых методов очистки кейлонов. Так, M_r лимфоцитарного кейлона по мере усложнения применяемых методов очистки менялась от 70 до 1,5 кД [38]. Эти факты позволяют предположить существование *in vivo* нековалентного комплекса кейлон-носитель, диссоциирующего по мере процедур очистки. Имеются косвенные данные о существовании носителей геляцитарного [39], гранулоцитарного [40], фибробластического [41] кейлонов. Если первоначально существование кейлонов в комплексе с высокомолекулярными биополимерами считали артефактом [42], обусловленным методами экстракции, то к настоящему времени считается установленным существование биополимеров с M_r 30—100 кД, способных образовывать комплексы с кейлонами [37]. Химическая природа носителей кейлонов практически не изучена, и лишь для лимфоцитарного кейлона имеются данные, позволяющие предположить, что его носитель—это РНК с M_r 25 кД [43].

Несмотря на недостаток информации о носителях кейлонов, имеется несколько гипотез об их функциях. Так, Werner, Schulte [44] считают, что ввиду сходства процессов клеточного цикла «действующая часть» одинакова у всех кейлонов, а тканеспецифичность определяется именно носителем. Рахманов и соавт. [37] предполагают, что именно носитель «удерживает» кейлон в клеточной популяции, а распад комплекса кейлон-носитель приводит к «утечке» кейлона из популяции и, как следствие, возникает неконтролируемая пролиферация клеток.

Факторы поздней асимметрии. В НИИ экспериментальной медицины АМН СССР с 1978 г. интенсивно ведутся работы по изучению так называемых факторов поздней асимметрии (ФПА), представляющих собой группу пептидов с M_r 1—2 кД и проявляющих свою активность при очаговых поражениях ЦНС [45—48]. В модельных экспериментах на животных показано, что при односторонних поражениях структур двигательного анализатора ЦНС продуцирует факторы, вызывающие асимметричное функционирование спинальных центров у таких животных, что проявляется в асимметрии мышечного тонуса задних конечностей. Острый посттравматический период соответствует максимальной активности ФПА в ликворе и экстрактах мозга патологических животных, а в период компенсации двигательных расстройств активность ФПА снижается, причем это снижение происходит в основном не за счет уменьшения пула ФПА, а за счет появления в ЦНС группы белковых факторов, которые способны образовывать с ФПА комплекс и тем самым инактивировать его [49]. Эти факторы инактивации (ФИ) являются термолабильными белками с M_r около 80 и 150 кД с ИЭТ 3,7—3,9 и 7,5—8,5. Часть этих белков специфически взаимодействует с белком А, что позволяет предположить их принадлежность к классу IgG. ФИ (M_r около

150 кД) обнаружены и в сыворотке крови патологических животных. По предварительным данным, ФИ сыворотки можно отнести к классу IgG. Показано, что экстракты мозга и цереброспинальная жидкость животных-доноров, компенсировавших патологию, способны устранять позную асимметрию у свежееперированных реципиентов, а также у реципиентов, позная асимметрия которых вызвана введением ФПА [50, 51]. Получены убедительные экспериментальные доказательства того, что феномен устранения позной асимметрии обусловлен ФИ. Показано, что введение свежееперированным реципиентам экстрактов мозга доноров с различным содержанием ФПА и ФИ может влиять на скорость восстановления двигательных нарушений [52]. В настоящее время имеются доказательства наличия ФПА и ФИ в интактной ткани ЦНС.

Приведенные выше экспериментальные данные свидетельствуют о существовании нейрогуморального контроля за функционированием спинальных центров в нормальной и патологической ЦНС, осуществляемого группой РП и группой высокомолекулярных белков, способной инaktivировать эти РП *in vivo* и *in vitro*, а также устранять действие этих РП на клетки-мишени спинного мозга. А одним из отличий патологического гомеостаза от нормального является изменение характеристик взаимодействия РП и белков-регуляторов их активности.

Вазопрессин и окситоцин. Данные о том, что вазопрессин и окситоцин транспортируются в портальное русло гипофиза в комплексе с белками-нейрофизинами, считаются хрестоматийными [53]. Несмотря на то, что физико-химические свойства нейрофизинов и особенности взаимодействия их с вазопрессином и окситоцином хорошо изучены, нейрофизинам приписывается лишь роль простых носителей, предохраняющих эти пептидные гормоны от действия протеаз [54].

Вещество Р. Установлены существенные отличия в поведении экзогенной субстанции Р в плазме человека от добавленной экзогенной. Так, скорость деградации экзогенной субстанции Р выше, чем у эндогенной, и ее можно удалить из плазмы сорбцией на активированном угле. Добавление ингибитора ангиотензинконвертирующего фермента увеличивает стабильность экзогенной субстанции Р в плазме. Эти данные позволяют предположить, что эндогенная субстанция Р в плазме связана с носителем, выполняющим протекторную функцию [55].

Кардиотропные нейрогормоны гипоталамуса. В гипоталамусе идентифицированы олигопептидные факторы «К», «Г», «С», обладающие коронарорасширяющим действием. Эти нейрогормоны локализованы в синаптической фракции, выделенной из ткани гипоталамуса, и содержатся там в комплексе с белками-носителями (БН). Несмотря на то, что комплексы БН с нейрогормонами обнаруживаются и в сыворотке крови, в висцеральных органах их содержание значительно варьирует. Так, в ткани сердца, скелетных мышцах и надпочечниках обнаруживается комплекс БНС, в надпочечниках и панкреатической железе присутствует БНГ, в печени—БНК. В селезенке, легких и почках эти комплексы практически отсутствуют. Это позволяет предположить, что

основная функция БН—это избирательный транспорт нейрогормонов к клеткам-мишеням. Имеются также данные о том, что в крови нейрогормоны «К» и «С» находятся в связанном виде с γ -глобулинами и в таком виде транспортируются к сердцу. Для БН нейрогормонов «С», «К», «Г» значения M_r составляют 20, 24 и 39 кД соответственно. Исследование состава БН позволило отнести их к типу N-гликозидосвязанных, маннозообогащенных гликопротеинов. Связь между БН и нейрогормонами имеет гидрофобный характер и разрушается при рН ниже 3.0 и при температуре -20° и 65° . Среди продуктов БН нейрогормонов «К» и «С» трипсином и кислыми гипофизарными катепсинами обнаруживаются фрагменты, обладающие высокой коронарорасширяющей активностью, что позволяет рассматривать эти БН в роли предшественников кардиотропных гормонов [56—58].

Таким образом, белковые носители могут одновременно осуществлять направленный транспорт и являться предшественниками РП.

Все приведенные выше экспериментальные данные указывают на существование важного, но еще практически не изученного механизма регуляции биологической активности РП, включающего взаимодействие РП с высокомолекулярными веществами, что приводит к появлению РП в свободной и связанной с носителем формах. Носители по своей химической природе принадлежат в основном к классам белков или к гликопротеидам и реже—к нуклеиновым кислотам.

Среди белков-носителей идентифицированы альбумины, иммуноглобулины, ферменты крови и прочие белки с M_r 10—150 кД. Известно, что альбумины являются переносчиками для нескольких десятков биологически активных веществ: витаминов, стероидных гормонов, лекарственных препаратов и т. д. [59]. Поэтому можно предположить, что альбумины как носители обладают наименьшей специфичностью по отношению к РП, а иммуноглобулины—наибольшей. Следует отметить также, что для одного РП может существовать несколько белков-носителей, обладающих различными химическими и биологическими свойствами.

Следует отметить, что образование комплекса РП-носитель может существенно модифицировать свойства РП: инактивировать РП, активировать РП, определять средство к клеткам-мишеням. Носители могут также выступать в качестве депонатора РП, протектора РП от протеаз, антагониста действия РП, предшественника РП.

Образующийся комплекс РП-носитель может диссоциировать *in vivo* при изменении физиологического состояния организма, *in vitro*—при изменении рН среды. Такая диссоциация может происходить обратимо и необратимо.

Образование комплекса РП-носитель может приводить к конформационным изменениям молекулы носителя. Если носитель является ферментом, то происходит изменение ферментативной активности носителя, что может вызвать к изменениям метаболизма отдельного органа или организма в целом.

Одним из аспектов взаимодействия РП с носителем *in vivo* является защищенность РП от антител. Не исключено, что в основе значи-

тельного разброса при количественных радиоиммунных определениях РП в экстрактах органов или биологических жидкостей у разных авторов [60] лежит отсутствие однотипных химических процедур, приводящих к полной диссоциации комплексов РП-носитель. Другим аспектом таких взаимодействий может быть изменение свойств биотестируемого материала в процессе его фракционирования физико-химическими методами [51].

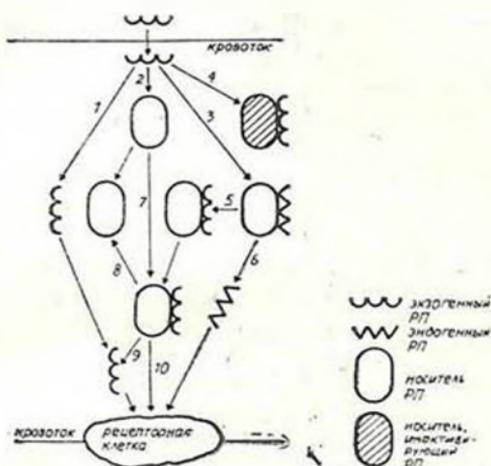


Рис. Схематическое изображение процессов, происходящих при введении в организм регуляторных пептидов

С позиции описанных и обсужденных выше экспериментальных фактов можно следующим образом представить те процессы, которые происходят при введении РП в организм (рисунок). Введение экзогенного РП (эРП) в кровь, например, приводит к появлению пула свободного эРП (путь 1), пула комплекса эРП-носитель (путь 2), пула эндогенного РП, отличного от эРП по своей химической природе и вытесненного с носителя эРП (путь 3—6). Возникающий физиологический эффект может быть обусловлен соответственно эРП, эндогенным РП и комплексом эРП-носитель (путь 2—7—10). Увеличение количества вводимого эРП должно приводить к увеличению пула эндогенных РП (причем могут проявляться качественно различные эндогенные РП) и к появлению новых биоэффектов соответственно. Можно предположить, что наиболее естественными для каждого эРП будут те биоэффекты, которые вызываются концентрациями, наиболее близкими к физиологическим. Процессы, протекающие по путям 1, 2, 3, могут участвовать в реализации таких свойств РП, как полифункциональность и дозовая зависимость.

Можно предположить о существовании некоей «буферной» системы белков крови, способных в определенных пределах связывать и инактивировать эРП, подобно тому, как альбумин комплексует попавшие в кровь ксенобиотики [59], и тем самым способствовать поддержанию гомеостатического постоянства организма (путь 4).

Комплекс эРП-носитель, циркулирующий в крови, постепенно диссоциирует (путь 2—7—8), что приводит к поддержанию некоторой минимальной концентрации эРП (путь 2—7—9), что может проявляться в удержании физиологических эффектов существенно более длительному, чем время жизни самого РП в крови. Комплекс эРП-носитель может интеркарировать в клетки-мишени и воздействовать на геном, что также приводит к отсроченным эффектам.

Модуляторность действия РП может быть обусловлена отличиями состава внутренней среды организма или органа, вызванного патологическим процессом, что приводит к формированию комплексов эРП-носитель со свойствами, отличными от тех, что существуют при нормальном гомеостазе.

На основании приведенных данных проблема изучения носителей РП представляется весьма актуальной. Помимо изучения фундаментальных механизмов регуляции действия РП, изучение проблемы носителей позволит решить и ряд задач прикладного характера (пероральное введение РП, преодоление барьерных преград, пролонгация действия РП). Необходимо отметить, что в настоящее время уже имеются примеры использования высокомолекулярных носителей РП для решения задачи уменьшения пула эндогенных РП. В качестве носителей в этих исследованиях выступают аутоантитела, вырабатываемые животными в ответ на введение им конъюгированных РП. Таким путем было достигнуто уменьшение эндогенного пула вазопрессина, окситоцина, соматостатина, кортиколиберина, фрагментов АКГГ, что приводило и к соответствующим физиологическим эффектам [61, 62]. Однако очевидные неопределенности подобного подхода делают этот путь далеким от прикладного применения. В то же время получение эндогенных носителей индивидуальных РП в чистом виде и последующее введение их в организм, а также познание механизмов их биогенеза позволит осуществить регуляцию активности РП *in vivo* именно тем путем, который избран самой природой.

PROGRESS IN OPINIONS ON THE NATURE AND FUNCTION. OF THE HIGH MOLECULAR WEIGHT CARRIERS OF REGULATORY PEPTIDES

DANILOVSKY M. A.

Scientific Research Institute of the Experimental Medicine, USSR Acad.
Medical Sci., Leningrad

The interaction between the regulatory peptides, such as insulin, gastrin, cholecystokinin, peptide regulators of cell proliferation, vasopressin, oxytocin, substance P etc. and endogenous high molecular carriers has been reviewed. The problems of chemical and biological nature of endogenous carriers and their role as the depositors, protectors, activity modulators, antagonists and transmitters of regulatory peptides to their target cells have been discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И. П. Весп. мед. химии, № 3, с. 3—7, 1984.
2. Ашмарин И. П. Биохимия, т. 51, № 4, с. 531—545, 1986.
3. Никифорович Г. В., Галактионов С. Г., Чипенс Г. И. Конформации пептидных био-регуляторов, М., Медицина, 1983.
4. Клуша В. Е. Пептиды-регуляторы функций мозга, Рига, Зинатне, 1984.
5. Кусень С. И., Стойка Р. С. Молекулярные механизмы в действии полипептидных факторов роста, М., Наука, 1986.
6. Узбеков М. Г. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 95, № 2, с. 38—40, 1983.
7. Котов А. В., Келсица А. Ф., Кузнецова С. А., Пальцев М. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 94, № 6, с. 68—71, 1982.
8. Титов С. А., Шамакина Н. Ю., Ашмарин И. П. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 95, № 2, с. 31—33, 1983.
9. Ашмарин И. П., Антонова Л. В., Титов М. И., Обухова М. И. Журн. высш. нервн. деят.-сти, № 6, с. 1196—1203, 1980.
10. Гомазов О. А. Весп. мед. химии, № 3, с. 79—86, 1984.
11. Еропкин М. Ю. Успехи соврем. биол., т. 95, с. 65—83, 1983.
12. Ашмарин И. П. Журн. эволюц. биохимии, № 1, с. 3—10, 1982.
13. Чазов Е. И., Титов М. И., Виноградов В. А., Смагин В. Г., Смирнов В. Н. Весп. мед. химии, № 3, с. 47—51, 1984.
14. Chang K. J., Guatrecases P. Federal. Proc., v. 40, p. 2729—2734, 1981.
15. Кусень С. И. Успехи соврем. биол., т. 94, с. 376—392, 1982.
16. Зайятин А. А. Нейропептиды: их роль в физиологии и патологии, тезисы докладов Всесоюзной конференции, с. 10—11, Томск, 1985.
17. Климов П. К. Физиологическое значение пептидов мозга для деятельности пищеварительной системы, Л., Наука, 1986.
18. Shaw W. N. Biochemistry, v. 2, p. 286—288, 1963.
19. Froesch E. R. Biochim. et biophys. acta, v. 121, p. 349—351, 1966.
20. Antonides H. N., Gundersen K. Endocrinology, v. 70, p. 95—98, 1962.
21. Старосельцева А. К.—В кн.: Биохимия гормонов и гормональной регуляции (под ред. К. А. Юдеева), с. 93—125, М., Наука, 1976.
22. Грачева Н. К. Проблемы эндокринологии, т. 18, № 4, с. 61—64, 1972.
23. Грачева Н. К., Мкртумова Н. М., Старосельцева А. К. Проблемы эндокринологии, т. 18, № 2, с. 102—106, 1972.
24. Полосатов В. М. Физиол. журн. СССР, т. 62, № 2, с. 315—318, 1978.
25. Полосатов В. М. Физиол. журн. СССР, т. 62, № 3, с. 466—468, 1978.
26. Полосатов В. М. Докл. АН СССР, т. 231, № 6, с. 1493—1494, 1976.
27. Полосатов В. М. Физиол. журн. СССР, т. 63, № 5, с. 750—752, 1977.
28. Полосатов В. М., Климов П. К. Физиол. журн. СССР, т. 63, № 12, с. 313—319, 1977.
29. Gregory R. A. J. Physiol., v. 241, № 1, p. 1—31, 1974.
30. Grossman M. N. Ann. Intern. Med., v. 64, № 1, p. 212—216, 1966.
31. Климов П. К., Полосатов В. М. Заболевания органов пищеварения, № 10, с. 59—65, 1977.
32. Cornell H. J. Int. J. Biochem., v. 15, № 4, p. 553—558, 1983.
33. Lembach K. J. Proc. Nat. Acad. Sci., USA. Biol. Sci., v. 73, p. 183—187, 1976.
34. Knauer D. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. Biol. Sci., v. 79, p. 2310—2314, 1982.
35. Clementopoulos D. P., Underwood L. E., Chatelain P. J., Van Wyk J. J. J. Clin. Endocrinol. and Metabol., v. 56, № 2, p. 384—389, 1983.
36. Рахманов Ю. А., Кетлинский С. А., Антошин А. И., Охулов В. Б. Кейлоны и регуляция деления клеток М., Медицина, 1984.
37. Охулов В. Б., Колобова А. А. Иммунология, № 4, с. 12—20, 1981.

39. Verly W. G.—In: Chalones (ed. J. Houch), p. 401—425. N. Y., Pergamon Press, 1976.
40. Paukovits W. R.—In: Chalones (ed. J. Houch), p. 311—330. N. Y., Pergamon Press, 1976.
41. Richter K. H., Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem., Bd. 359, № 10, S. 1435—1439, 1978.
42. Matolo A. T. Boll. Ist. Sieroten, Milan, v. 54, p. 235—238, 1975.
43. Houc K. J. C. J. Reticuloendoth. Soc., v. 24, p. 571—526, 1978.
44. Werner D., Schulte M. Eur. J. Cancer, v. 11, p. 521—526, 1975.
45. Вартамян Г. А., Балабанов Ю. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 86, № 2, с. 147—150, 1978.
46. Вартамян Г. А. Физиол. человека, т. 7, № 3, с. 474—479, 1981.
47. Вартамян Г. А., Клементьев Б. И. Физиол. человека, т. 9, № 1, с. 122—126, 1983.
48. Вартамян Г. А., Варлинская Е. И. Физиол. человека, т. 12, № 1, с. 82—86, 1986.
49. Даниловский М. А., Токарев А. В., Клементьев Б. И. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 83, № 8, с. 132—135, 1985.
50. Даниловский М. А., Дулинсу В. В., Беленков Н. Ю., Вартамян Г. А. Физиол. журн. СССР, т. 73, № 5, с. 602—606, 1987.
51. Даниловский М. А., Клементьев Б. И., Вартамян Г. А. Докл. АН СССР, т. 278, № 2, с. 488—491, 1984.
52. Птицина И. Б., Даниловский М. А. Физиол. журн. СССР, т. 72, № 7, с. 888—892, 1986.
53. Walter R. Ann. N. Y. Acad. Sci., v. 248, p. 1—512, 1975.
54. Breslow E. Ann. Rev. Biochem., v. 48, p. 251—274, 1979.
55. Cannon D., Kravaneck S., Powell D. Arch. Pharmacol., v. 307, p. 251—255, 1979.
56. Срапионян Р. М. Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 109—116, 1987.
57. Галоян А. А. Вопр. биохимии мозга, Изд-во АН АрмССР, Ереван т. 13, с. 9—38, 1978.
58. Саакян Н. С., Срапионян Р. М., Саакян Ф. М., Попова Т. В., Галоян А. А. Нейрохимия, т. 3, № 1, с. 12—20, 1984.
59. Луйк А. И., Лукьянович В. Д. Сывороточный альбумин и биотранспорт ядов. Л., Медицина, 1984.
60. Ашмарин И. П. Журн. высш. нервн. деят-сти, т. 35, в. 2, с. 211—221, 1985.
61. Ашмарин И. П. Чтения им. А. Д. Сперанского, 12 января 1984 г., с. 2—8, М.
62. Антонова Л. В., Бурбасова Г. Ш., Каменский А. А., Ашмарин И. П. Докл. АН СССР, т. 258, № 6, с. 1477—1480, 1981.

Поступила 27. V 1988,



УДК 612.015.12:611.019

2',3'-ЦИКЛОНУКЛЕОТИД 3'-ФОСФОДИЭСТЕРАЗА

СУРВИЛАДЗЕ З. Г.

Институт молекулярной биологии и биологической физики АН ГССР, Тбилиси

В обзоре представлены литературные данные о природе и свойствах 2',3'-циклонуклеотид 3' ФДЭ—фермента, являющегося маркером миелина. Рассмотрены вопросы о локализации, распространении фермента, свойствах, способах его очистки, активаторах и ингибиторах. Приведены данные об индуктивном синтезе фермента в клеточных культурах, о посттрансляционной его модификации и изменениях при заболеваниях мозга.

Еще в 1962 г. Grimmond и соавт. [1] обнаружили, что в мозгу имеется особая ФДЭ, которая способствует превращению 2',3'-циклонуклеотидов в 2'-нуклеотиды (ЦНФаза ЕС 3.1.4.37). Однако до настоящего времени этот фермент является загадкой для исследователей: не установлена его физиологическая роль, не конкретизирован нативный субстрат его действия.

Уже давно известно, что этот фермент локализован в миелине, который содержит 60% ЦНФазной активности всего головного мозга, где ее активность в два раза выше, чем в спинном мозгу [2, 3]. В то же время высокой ферментативной активностью характеризуются и клетки, образующие миелин в ЦНС и ПНС—олигодендроциты [4] и Шванновские клетки [5]. В ПНС ЦНФаза гораздо менее активна, чем в белом веществе мозга [2, 6], но свойства фермента ЦНС и ПНС подобны (связываются одной поликлональной антисывороткой [6], имеют идентичный аминокислотный состав [7]). Интересно, что с помощью моноклональных антител (даже при их высокой концентрации), ЦНФаза не обнаружена в ПНС [8, 9]. Возможно, это обусловлено определенными иммунологическими различиями фермента в ПНС и ЦНС.

ЦНФаза в плазматической мембране олигодендроцитов распределена неравномерно. В мембране тела клетки активность фермента низкая [10], а в окончаниях отростков олигодендроцитов в местах прикрепления к нервным волокнам—высокая [11].

Промежуточной фракцией между плазматической мембраной олигодендроцита и компактным миелином является миелинподобная фракция SN₄. Пехавано, что активность фермента в этой фракции гораздо выше,

чем в миелине [12, 13]. При центрифугировании в градиенте сахарозы миелин делится на субфракции: тяжелую и легкую. Тяжелая фракция, которая представляет собой более раннюю стадию формирования миелина, характеризуется более высокой активностью ЦНФазы, чем легкая [14].

Относительно высокая активность ЦНФазы обнаружена также в культуре клеток глиомы крысы С₆ [15], в линии нейрональных клеток ЦНС (В 104) [16] и в волокнах оптического нерва и фоторецепторном слое сетчатки глаза ряда животных [17, 18].

Наличие ЦНФазы показано также и во многих ненейрональных тканях, однако ее активность в них не превышала 3% ЦНФазной активности мозга [19].

В ранних работах для исследования клеточной локализации ЦНФазы использовали эритроциты и клетки нейробластомы. Установлено, что в эритроцитах ЦНФаза локализована на внутренней поверхности мембраны [20], а в клетках нейробластомы (В 104 линия) фермент ассоциирован с мембраной эндоплазматического ретикулаума [16]. Для изучения локализации ЦНФазы в олигодендронитах и глиомных клетках С₆, то есть в клетках с высокой активностью ЦНФазы, измеряли ферментативную активность в интактных и разрушенных клетках [21]. Оказалось, что нативные клетки почти не гидролизуют 2',3'-циклоуклеотиды, тогда как разрушенные клетки имеют высокую ЦНФазную активность. Результаты иммунофлуоресцентного анализа также свидетельствуют, что каталитический и основной антигенный участок фермента находятся внутри клетки.

Таким образом, как в неродственных миелину клетках, так и клетках, которые принимают участие в образовании миелина ЦНС, ЦНФаза локализована внутри клетки.

ЦНФаза—маркер миелина. В отличие от других миелиновых белков—основного белка миелина (ОБМ) и протеолипидного белка (ПЛБ)—ЦНФаза обнаруживается в мозгу сразу после рождения животного [22], и ее активность увеличивается параллельно с филогенетическим развитием [23]. Исключения составляют амфибии, в миелине которых фермент обладает очень высокой специфической активностью уже на ранних этапах развития. Отмечено, что активность ЦНФазы головастика *Xenopus laevis* выше, чем у взрослой формы амфибии [24].

При сравнении активности фермента в разных участках мозга крысы на разных стадиях развития было выявлено, что активность ЦНФазы возрастала между 4—120 днями развития, что хорошо коррелировало с увеличением концентрации ОБМ, активности цереброзид сульфотрансферазы и началом миелинизации (*in vivo* и *in vitro*) [22]. В мутантных линиях мышей «Jmpu» и «Quaking» со сниженным содержанием миелина и, соответственно, его белков, активность фермента низкая [25]. Все эти данные позволяют использовать ЦНФазу в качестве маркера миелина и миелинизации [12, 22].

ЦНФаза является белком, который при миелинизации первым включается в состав миелина. Только после этого происходит включение других белков—миелинассоциированного гликопротеина (МАГ), ОБМ и ПЛБ [14]. В отличие от других метаболически стабильных белков миелина, ЦНФаза является самым активным (период полураспада этого белка на порядок меньше, чем у других белков миелина) [14].

При электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-Na очищенная ЦНФаза (человека, морской свинки, кролика и крысы) делилась на две полосы (ЦН_а и ЦН_б). Разница в величине M_r между ними составляла 2,5—3 кД. Аналогичная картина получалась при форефе В1 белков Вольфграма (В1_а и В1_б) [26]. Белки Вольфграма (ВВ) являются высокомолекулярными кислыми белками, которые осаждаются при обработке миелина смесью хлороформа и метанола. При электрофорезе в ПААГ в присутствии ДДС-Na ВВ делились тоже на две основные полосы: В1 и В2 [27]. На основании иммунологических и химических данных было установлено, что белок В2 подобен тубулину [28, 29]. Целый ряд фактов, полученных разными аналитическими методами, позволяет полагать, что В1 белок является инактивированной формой ЦНФазы или подобным ей белком [6, 26, 30]. Отсутствие ферментативной активности можно объяснить тем, что выделение В1 происходит в условиях, при которых фермент инактивируется (обработка смесью хлороформа и метанола), однако такая обработка не влияет на электрофоретическую подвижность фермента. При электрофорезе ЦН_а мигрирует вместе с В1_а, а ЦН_б—с В1_б [30]. Моноклональные антитела, специфически «узнающие» молекулы ЦНФазы, также связывают белки Вольфграма В1_а и В1_б [8]. Исходя из совокупности приведенных фактов, предположение, что В1_а и В1_б являются неактивными формами ЦНФазы, вполне возможно, хотя однозначно утверждать это до установления первичной структуры этих белков преждевременно.

ЦН_а и ЦН_б имеют несколько разные иммунологические свойства. ЦН_в связывается моноклональными антителами лучше, чем ЦН_а [8].

Очистка фермента и определение активности. Считают, что единственным субстратом ЦНФазы являются 2',3'-циклонуклеотиды. Другие фосфодиэфирные связи нуклеотидов (например, 3',5'-циклонуклеотиды) не доступны для фермента. Для определения ферментативной активности в качестве субстрата использовали 2',3'-сАМР, 2',3'-сСМР и 2',3'-сNADP. В результате гидролиза этих нуклеотидов образуются 2'-нуклеотиды. Существуют различные методы количественного определения 2'-нуклеотидов. Чаще всего используются спектрофотометрический [31], флуорометрический [32] и различные хроматографические методы [2, 33—35]. Во многих работах для отщепления 2'-фосфата от нуклеотида используют другой фермент (например, щелочную фосфатазу *E. coli*), определяя затем количество P_i [36].

Несмотря на малое сродство с ЦНФазой, 2',3'-циклонуклеотиды (K_{1/2} ~ 10 мМ) были использованы для выделения и очистки фермента. ЦНФаза была изолирована из ЦНС человека [37], быка [38, 39], мор-

ской свинки, крысы: [40]. Использованные разными авторами методики выделения частично отличались друг от друга: по-видимому, из-за этого различны приводимые величины U , A и K_m для очищенного фермента из разных источников.

Свойства фермента. а) Субстрат и продукт реакции. Полагают, что 2',3'-цикло-нуклеотиды не являются физиологическими субстратами фермента. В тканях, содержащих ЦНФаза, не обнаружены ни субстрат реакции (2',3'-нуклеотиды), ни продукт реакции (2'-нуклеотиды). 2',3'-нуклеотиды являются промежуточным продуктом гидролиза РНК, но они не обладают какой-либо физиологической активностью. Исключение составляет синтезированный биологически активный аналог 2',3'-сАМР— $ReAMP$ (метил 5'/6-амино-пури-9- $YL/5'$ -дезоксид- β -D-рибофуранозид 2',3'-цикломонофосфат). $ReAMP$ ингибирует пролиферацию раковых клеток (НТ-20) и не расщепляется 3',5'-сАМР ФДЭ [41].

Однако полученные за последнее время данные указывают на важность наличия 2',3'-циклических связей в конце молекулы РНК. В образовании этих связей принимают участие различные ферменты: Т4 РНК лигаза, дрожжевая эндонуклеаза, активно участвующая в механизме сплайсинга, целый ряд различных РНКаз. В клетках HeLa обнаружена специфическая РНК циклаза, образующая именно 2',3'-цикло концы [42].

Функциональная роль 2'-нуклеотидов также не установлена. Однако надо отметить, что в мозгу млекопитающих идентифицированы различные 2'-нуклеотидазы [43, 44]. Обнаружено, что мио-инозитол-1-фосфатаза (ЕС 3. 1. 3. 25, ключевой фермент метаболизма фосфоинозитидов) также обладает 2'-нуклеотидазной активностью. Приведенные данные являются основанием для предположения, что 2'-нуклеотиды могут играть особую роль в мозгу млекопитающих, и тогда регуляция их содержания должна быть связана с активностью ЦНФазы.

б) Физико-химические свойства. ЦНФаза представляет собой гидрофобный белок, в молекуле которого большинство аспарагиновых и глютаминовых кислотных остатков амидированы. Вследствие этого изоэлектрическая точка находится между рН 8,5—9,5. Аминокислотный состав фермента, выделенного из мозга человека, быка, кролика, морской свинки и крысы, сходен [30]. Долгое время не удавалось расшифровать первичную структуру ЦНФазы. Только с применением методов гениной инженерии удалось решить эту проблему [45].

ЦНФаза указанных выше пяти видов лучше гидролизует 2',3'-цикло-пуриновые нуклеотиды (сА>сG), чем пиримидиновые (для фермента, выделенного из мозга крысы—сU>сC, а для ЦНФазы из мозга быка и человека—сC>сU) [1, 37, 40]. При ограниченном протеолизе фермента разными протеазами (эластаза поджелудочной железы свинки, панкреатический трипсин, проназа из *Streptomyces griseus*) образуются ферментативно активные полипептиды с M_r 40, 30 и 20 кД [46].

в) Активаторы и ингибиторы. Нейтральные детергенты активируют фермент как в чистом виде, так и в мембранных фракциях. Лучшими активаторами являются ионидет Р 40 (NP-40) и тритон X-100. При добав-

лении ДДС-Na фермент инактивируется. При исследовании влияния гидрофильной и гидрофобной среды на активность ЦНФазы было установлено, что фермент лучше активируется гидрофильными белками (гистон, ОБМ, сывороточный альбумин быка).

Различные полинуклеотиды и гепарин ингибируют фермент, однако при добавлении в реакционную смесь ОБМ или гистона активность ЦНФазы восстанавливается [47].

Для активности многих мембранных ферментов необходимо присутствие липидов. В отличие от них, ЦНФаза проявляет активность и в отсутствие липидов, хотя последние изменяют уровень ее активности. Холестерин, все ацилглицерин (кроме триолеина), все фосфоглицериды и сфингомиелин стимулируют активность ЦНФазы; лучшим активатором является фосфатидилсерин. При низких концентрациях холестерина и высоких концентрациях ганглиозидов фермент ингибируется примерно на 40% [33]. Для проявления активности фермента не требуются катионы металлов. CaCl_2 , MgCl_2 , ZnCl_2 , MnCl_2 , NaF , ЭДТА, ЭГТА при высоких концентрациях лишь незначительно меняют активность ЦНФазы; в то же время CuCl_2 является сильным ингибитором фермента. Активность последнего также значительно подавляется в присутствии теофиллина, кофеина, ртуторганических соединений (*n*-хлормеркуриформил сульфоновой кислоты) и тимиразола [48].

1) *Посттрансляционная модификация*. Единственным белком миелина, фосфорилируемым специфическими протеникиназами *in vivo*, считали ОБМ [49, 50], однако в других исследованиях было показано, что сАМР-зависимая протеникиназа не модифицирует ОБМ, а специфически фосфорилирует ЦНФазу [51]. Физиологическое значение такой модификации фермента не ясно, так как при этом не изменялись величины K_m и V ЦНФазы. Представляет интерес, что та же протеникиназа фосфорилирует один из компонентов БВ [52], что еще раз указывает на сходство этого компонента с ЦНФазой.

2) *Индуктивный синтез*. В культуре глиомы C_6 активность ЦНФазы может увеличиваться в два раза и более при добавлении норадреналина (НА) [53]. Можно полагать, что активирование вызвано взаимодействием НА с β -адренергическими рецепторами, то есть происходит благодаря увеличению внутриклеточной концентрации сАМР. Основанием для такого предположения служат следующие факты: а) изепротеренол—аналог катехоламиннов, более специфичный к β -адренергическим рецепторам, чем НА, индуцирует увеличение активности ЦНФазы в большей степени, чем НА в той же концентрации; б) антагонисты β -рецепторов (*dl*-дихлоронзопротеренол и *dl*-пропранолол) при низких концентрациях блокировали эффект НА, тогда как антагонисты α -рецепторов (пентоламин и феноксибензамин) не ингибировали активность фермента даже при высоких концентрациях. Эти результаты указывают на то, что в глиомных клетках сам по себе сАМР должен индуцировать усиление активности ЦНФазы. Действительно, добавление аналога сАМР—дибутирилсАМР (дбсАМР), легко проникающего через мембрану, индуцировало

активность фермента [53] по-видимому за счет увеличения концентрации молекул ЦНФазы, так как скорость гидролиза фермента (период полураспада) не менялась [54]. Ингибиторы же синтеза белка (циклогексимид) и мРНК (кордицепин и α -аминитин) в значительной степени блокировали индукцию ЦНФазы.

Подобные результаты были получены и при исследовании клеточных культур олигодендроцитов мозга крысы. Было установлено, что добавление дбсАМР приводит к увеличению активности ЦНФазы на 200—240%, что было, вероятно, связано, как и в случае клеток С₆, с увеличением внутриклеточной концентрации ЦНФазы [55].

Кроме сАМР и его аналогов, на индукцию ЦНФазы могут влиять и другие факторы: а) Увеличение плотности клеток в культуре [56, 57]. Так, на примере культуры клеток С₆ показано, что с увеличением плотности клеток активность фермента увеличивалась в 4 раза. В отличие от ЦНФазы, Na^+ , K^+ -АТФазная активность при этом не менялась. В культуре с низкой плотностью клеток для достижения максимальной активности ЦНФазы требуется больше времени, чем при высокой их плотности [57]. При изучении этого феномена выяснилось, что имеются, по-видимому, два разных, не связанных между собой, механизма индукции активности ЦНФазы; дбсАМР обуславливает увеличение активности фермента независимо от плотности клеток, при индукции ЦНФазы под действием сАМР или НА плотность клеток в культуре и скорость их пролиферации не изменялись.

б) Удаление из среды сыворотки [57]. Специфическая активность фермента увеличивалась в 3—4 раза, в то время как активность Na^+ , K^+ -АТФазы менялась незначительно.

в) Добавление в культуру клеток С₆ компактна, специфического ингибитора 3'-гидрокси-3-метилглутарил коэнзим-А-редуктазы (КФ I. 1. 1. 34) и синтеза холестерина, препятствовало увеличению активности ЦНФазы, индуцированному удалением сыворотки из среды, не влияя при этом на активность Na^+ , K^+ -АТФазы и синтез белка [58].

г) Полярные группы фосфолипидов [59]. При обработке культуры С₆ $\text{N,N}'$ -диметилэтаноламином (аналогом холина) индукция ЦНФазы, вызванная удалением сыворотки, ингибировалась. Это торможение индукции было обратимо и специфично, так как на активность Na^+ , K^+ -АТФазы и синтез белка такая обработка не влияла.

д) Клеточный цитоскелет (в частности, микротрубочки и микрофиламенты). Добавление в культуру клеток С₆ колхицина (специфически связывающегося с микротрубочками) и цитохалазина Д (связывающегося с микрофиламентами) тормозило индукцию ЦНФазы, вызванную удалением из среды сыворотки, катехоламинами, дбсАМР, холестерином. Ингибирующие концентрации использованных агентов совпадали с теми концентрациями, которые необходимы для разрушения цитоскелета. Люминоколхицин—изомер колхицина, не влияющий на микротрубочки—не влиял на индукцию ЦНФазы [60].

е) Гормоны, в частности L-3, 3', 5 триидотиронин (Т₃) и тироксин.

(Т₃) [61]. Их влияние на индуцирование ЦНФазы было показано для культуры эмбриональных клеток мышцы. При использовании сыворотки с низкой концентрацией Т₃ и Т₄ (нормальные сыворотки содержат эти гормоны в больших количествах) активность ЦНФазы была низкой, однако после добавления Т₃ она восстанавливалась до нормального уровня.

ЦНФаза при разных заболеваниях. Как уже отмечалось, в мутантных линиях мышей «Jipru» и «Quaking» активность фермента низкая. Однако в мутантной линии «Shiverer» активность ЦНФазы почти не отличалась от контроля. У этих мутантов на фоне снижения концентрации ПЛВ и ОБМ установлено повышенное процентное содержание БВ [62].

При различных заболеваниях мозга человека, например, при рассеянном склерозе и лейкодистрофии, понижение активности ЦНФазы обусловлено не только уменьшением ее количества (параллельно миелину), но и понижением специфической активности. Отмечено, что при рассеянном склерозе специфическая активность уменьшалась на 45% [63]. В миелине, выделенном при различных формах лейкодистрофии (заболеваниях, связанных с нарушением метаболизма липидов), специфическая активность ЦНФазы понижена в еще более значительной степени (75—90%) [64]. Уменьшение активности ЦНФазы при разных демиелинизирующих заболеваниях может быть использовано как тест для выявления ранних стадий болезни.

В заключение надо отметить, что, несмотря на значительное количество накопленных фактов о ЦНФазе, многое еще остается неизученным. Большинство исследований проведено в разных экспериментальных условиях с использованием различных препаратов фермента (частично очищенные, клеточные экстракты), что осложняет сопоставление и интерпретацию данных. Однако независимо от этого ЦНФаза уже используется в качестве маркера при анализе некоторых физиологических процессов. Например, показано, что под действием фактора роста ее активность увеличивалась, что коррелировало с повышением способности к обучению у крыс [65].

Нельзя исключить участие фермента в инициации миелинизации, учитывая локализацию ЦНФазы в мембране олигодендроцитов и тот факт, что ЦНФаза при миелинизации первой включается в состав миелина [14].

Как указывалось выше, в мозгу млекопитающих обнаружены различные ферменты, обладающие 2'-нуклеотидазной активностью. В результате действия этих ферментов может образоваться и аденозин, играющий важную роль в осуществлении целого ряда физиологических функций. ЦНФаза может быть «поставщиком» субстрата для этих ферментов, участвуя в одном из путей образования аденозина.

Недавно было обнаружено, что ЦНФаза обладает также 5'-полинуклеотидкиназной активностью. Она катализирует перенос фосфата от [³²P]-АТР к тРНК. Этими же активностями (протеникиназной и 2'3'-циклонуклеотидфосфодиэстеразной) характеризуется и РНК лигаза млекопитающих. Однако лигазная активность у ЦНФазы не обнаружена.

Считают, что натуральным субстратом ЦНФазы является РНК, и фермент может принимать участие в реакциях процессинга или сплайсинга [48].

Остается неясной роль ЦНФазы при различных демиелинизирующих заболеваниях. Поскольку фермент в этих случаях не изолирован и не охарактеризован, то непонятно, чем вызвано уменьшение специфической активности фермента—каким-либо изменением в его активном центре или действием ингибитора, накапливающегося во время заболевания. Исследования в этих направлениях ведутся весьма интенсивно, что позволяет надеяться, что в скором будущем будут получены новые данные, способствующие установлению роли фермента при этих тяжелых поражениях нервной системы.

Автор приносит благодарность проф. Этингоф Р. Н. за ценные советы и помощь при написании обзора.

2',3'-CYCLONUCLEOTIDE-3'-PHOSPHODIESTERASE

SURVILADZE Z. G.

Institute of Molecular Biology and Biological Physics, Georgian SSR
Acad. Sci., Tbilisi

Literature data on the structure and properties of 2',3'-cyclo-nucleotide-3'-phosphodiesterase marker enzyme of myelin and myelinization are compiled. Distribution of the enzyme, its metabolism, purification and induction aspects are covered. Activators, inhibitors, substrates of the enzyme are considered. Data dealing with inductive synthesis of the enzyme, its posttranslational modifications and changes in brain pathology are presented.

ЛИТЕРАТУРА

1. Drummond G. I., Iyer N. T., Keith J. J. *J. Biol. Chem.*, v. 237, p. 3535—3539, 1962.
2. Kurihara T., Tsukada Y. *J. Neurochem.*, v. 14, p. 1167—1174, 1967.
3. Drummond G. I., Hamil E. B., Guha A. *J. Neurochem.*, v. 31, p. 871—878, 1978.
4. Poduslo S. E., Norton W. T. *J. Neurochem.*, v. 19, p. 123—127, 1972.
5. Reddy N. B., Askanas V., Engel W. K. *J. Neurochem.*, v. 39, p. 887—889, 1982.
6. Sprinkle T. J., Sheedlo H. J., Buxton T. B., Rising J. B. *J. Neurochem.*, v. 41, p. 1664—1671, 1983.
7. Lees M. B., Brostoff S. W.—In: *Myelin* (ed. P. Morrell), cb. 6, p. 197—224, New York—London, 1984.
8. Fujishiro M., Kohsaka., Nagaike K., Tsukada Y. *J. Neurochem.*, v. 47, p. 191—197, 1986.
9. Brenner T., Lisak R. P., Rostami A., McMorris F., Silberbary D. *J. Neurochem.*, v. 45, p. 54—60, 1985.
10. Snyder D. S., Zimmerman T. R., Farooq M., Norton W. T., Cammer W. *J. Neurochem.*, v. 40, p. 120—127, 1983.
11. Nishizawa Y., Kurihara T., Takahasht Y. *Brain Res.*, v. 212, p. 219—222, 1981.
12. Washneldt T. V.—In: *Adv. Exp. Med. Biol., Myelination and Demyelination*. (ed. J. Palo), v. 100, p. 117—133, Plenum Press, New York—London, 1978.
13. Washneldt T. V., Matthieu J.—M., Neuhoff V. *Brain Res.*, v. 138, p. 29—43, 1977.

14. *Benjamins J. A.*—In: *Oligodendroglia* (ed. W. T. Norton), ch. 3, p. 87—124, New York—London, 1981.
15. *Zanetta J. P., Benda P., Gombos G., Morgan I. G. J.* *Neurochem.*, v. 19, p. 881—893, 1972.
16. *Muller H. W., Clapshaw P. A., Seifert W. J.* *Neurochem.*, v. 37, p. 947—955, 1981.
17. *Kohsuka S., Nishimura V., Takamatsu K., Shimat K., Tsukada Y. J.* *Neurochem.*, v. 41, p. 434—439, 1983.
18. *Nishizawa Y., Kurihara T., Takahashi Y.* *Brain Res.*, v. 251, p. 384—387, 1982.
19. *Weissbarth S., Maker H. S., Roes I., Brannan T. S., Lapin E. P., Lehrer G. M. J.* *Neurochem.*, v. 37, p. 677—680, 1981.
20. *Dreiling C. E.* *Biochim. et biophys. acta* v. 649, p. 587—594, 1981.
21. *McMorris F. A., Kim S. U., Sprinkle T. J.* *Brain Res.*, v. 292, p. 123—131, 1984.
22. *Sprinkle T. J., Zaruba M. E., McKhann G. M. J.* *Neurochem.*, v. 30, p. 309—314, 1978.
23. *Drummond G. I., Eng D. Y., McIntosh C. A.* *Brain Res.*, v. 28, p. 153—163, 1971.
24. *Trapp B. D., McIntyre L. J., Quarles R. H., Nonaka G., Moser W., Moser H. W., Webster H. deF. J.* *Neurochem.*, v. 34, p. 1241—1246, 1980.
25. *Kurihara T., Nussbaum J. L., Mandel P. J.* *Neurochem.*, v. 17, p. 993—997, 1970.
26. *Drummond R. J., Dean G. J.* *Neurochem.*, v. 35, p. 1155—1165, 1980.
27. *Nussbaum J. L., Delannoy J. P., Mandel P. J.* *Neurochem.*, v. 28, p. 183—191, 1977.
28. *Reig J. A., Ramos A. M., Cozar M., Aguilar J. S., Criado M., Monreal J. J.* *Neurochem.*, v. 39, p. 507—511, 1982.
29. *de Nechaud B., Wolff A., Jeanlet C., Bourre J.—M. J.* *Neurochem.*, v. 41, p. 1538—1545, 1983.
30. *Sprinkle T. J., Wells M. R., Garver F. A., Smith D. S. J.* *Neurochem.*, v. 35, p. 1200—1208, 1980.
31. *Hugli T. E., Bustin M., Moore S.* *Brain Res.*, v. 58, p. 191—203, 1973.
32. *Trams E. G. J.* *Neurochem.*, v. 21, p. 995—997, 1973.
33. *Clapshaw P. A., Seifert W. J.* *Neurochem.*, v. 35, p. 164—169, 1980.
34. *Tsukada Y., Nagai K., Suda H. J.* *Neurochem.*, v. 34, p. 1019—1022, 1980.
35. *Alliquant B., Musenger C., Schuller E. J.* *Chromatog.*, v. 326, p. 281—291, 1985.
36. *Prohaska J., Clark D. A., Wells W. W.* *Anal. Biochem.*, v. 56, p. 275—282, 1973.
37. *Sprinkle T. J., Grimes M. J., Eller A. G. J.* *Neurochem.*, v. 34, p. 880—887, 1980.
38. *Suda H., Tsukada Y. J.* *Neurochem.*, v. 34, p. 941—949, 1980.
39. *Clapshaw P. A., Muller H. W., Seifert W. J.* *Neurochem.*, v. 36, p. 1996—2003, 1981.
40. *Wells M. R., Sprinkle T. J. J.* *Neurochem.*, v. 36, p. 633—639, 1981.
41. *Nair V., Wlechock R. J., Vitelli D. E., Singh D., Stevens R. H. J.* *Cyclic Nucl. Research*, v. 6, p. 189—200, 1980.
42. *Reinberg D., Arenas J., Hurwitz J. J.* *Biol. Chem.*, v. 260, p. 6088—6097, 1985.
43. *Nakamura M., Yamao S., Ito J., Kameyama M.* *Biochim et biophys. acta*, v. 568, p. 30—38, 1979.
44. *Takimoto K., Okada M., Matsuda Y., Nakagawa H. J.* *Biochem.*, v. 98, p. 363—370, 1985.
45. *Kurihara T., Fowler A., Takahashi Y. J.* *Biol. Chem.*, v. 262, p. 3256—3261, 1987.
46. *Muller H. W., Clapshaw P. A., Seifert W. J.* *Neurochem.*, v. 36, p. 2034—2012, 1981.
47. *Sprinkle T. J., Tippins R. B., Kestler D. P.* *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, v. 145, p. 686—691, 1987.
48. *Sprinkle T. J., Knerr J. R.* *Brain Res.*, v. 214, p. 445—459, 1981.

49. Turner R. S., Chou C.-H. J., Kibler R. F., Kus J. F. J. Neurochem., v. 39, p. 1397-1404, 1982.
50. Turner R. S., Chou C.-H. J., Mazzet G. J., Dembure P., Kus J. F. J. Neurochem., v. 43, p. 1257-1264, 1984.
51. Bradbury J. M., Thompson R. J. Biochem. J., v. 221, p. 361-368, 1984.
52. Bradbury J. M., Campbell R. S., Thompson R. J. Biochem. J., v. 221, p. 351-359, 1984.
53. McMorris F. A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, Biol. Sci. v. 74, p. 4501-4504, 1977.
54. McMorris F. A., Smith T. M., Sprinkle T. J., Auszman J. M. J. Neurochem., v. 44, p. 1242-1251, 1985.
55. McMorris F. A. J. Neurochem., v. 41, p. 506-515, 1983.
56. McMorris F. A. Biochim et biophys. acta, v. 762, p. 560-568, 1983.
57. Maltese W. A., Volpe J. J. Cell Physiol., v. 101, p. 459-470, 1979.
58. Volpe J. J., Obert K. A. J. Neurochem., v. 40, p. 530-537, 1983.
59. Volpe J. J., Imori Y., Haven G. G., Goldberg R. I. J. Neurochem., v. 46, p. 476-482, 1986.
60. Antonow J. A., Bhat N., Volpe J. J. J. Neurochem., v. 42, p. 1030-1039, 1984.
61. Bhat N. R., Shunker G., Pieringer R. A. J. Neurochem., v. 37, p. 695-701, 1981.
62. Mikoshiba K., Aoki E., Tsukada Y. Brain Res., v. 192, p. 195-204, 1980.
63. Gopfert E., Pytlík S., Debusch H. J. Neurochem., v. 43, p. 732-739, 1980.
64. Morell P., Norton W. T. Sci. American., v. 2425, p. 74-89, 1980.
65. Rottbak A. I.—In: Neuroglia, Fischer Verlag, Jena, 1983.

Поступил 14 V 1988.



ХРОНИКА

АЛЕКСАНДР ВАРТАНОВИЧ АРУТЮНЯН

(к 50-летию со дня рождения)

Исполнилось 50 лет со дня рождения и 25 лет научной деятельности заместителя главного редактора журнала «Нейрохимия», заведующего лабораторией Института биохимии АН АрмССР, доктора биологических наук А. В. Арутюняна.

Александр Вартанович Арутюнян родился 28 августа 1938 г. в Тбилиси в семье научного работника. После окончания Ростовского государственного университета, в 1962 г. переехал в Ереван, где, работая в Институте биохимии АН АрмССР под руководством академика АН АрмССР Г. Х. Буянтияна, сформировался как специалист в области нейрохимии и энзимологии.

В 1966 г. Арутюнян А. В. защитил кандидатскую диссертацию, посвященную изучению механизмов аммиакообразования в нервной ткани. Большинство дальнейших публикаций А. В. Арутюняна (1968—1979 гг.) освещает вопросы регуляции АМР-деаминазы и других ферментов, участвующих в метаболизме адениннуклеотидов в мозгу и других органах. Эти исследования легли в основу его докторской диссертации «Деаминарование адениннуклеотидов в мозговой ткани», успешно защищенной в 1974 г. А. В. Арутюнян и его сотрудники обнаружили возможность непосредственного деаминарования АТР и АДР в мозгу, а также установили комплексообразование АМР-деаминазы с гексокиназой и актомиозинподобным сократительным белком нервной ткани нейростенином и роль этих белок-белковых взаимодействий в регуляции АМР-деаминазы. Ряд исследований Арутюняна А. В. посвящен вопросам клинической энзимологии. Установлено, что нарушения в обмене адениннуклеотидов, обусловленные изменением активности и регуляции АМР-деаминазы эритроцитов и лейкоцитов, могут служить одним из важных диагностических тестов при развитии периодической болезни, широко распространенного в Армении аутоиммунного заболевания.

В последние годы в лаборатории, руководимой А. В. Арутюняном, проводится изучение метаболизма NAD и его некоферментных функций в нервной системе. А. В. Арутюнян является автором более 70 опубликованных работ. Некоторые из них отражают результаты совместных исследова-

ний, проведенных в ведущих зарубежных научных центрах (Отдел биохимии Брандайского университета, США; Отдел биохимии Медицинского университета Шимано, Япония). Арутюнян А. В. неоднократно выступал с научными докладами на конференциях по актуальным вопросам нейробиологии, проводимых в нашей стране и за рубежом.

А. В. Арутюнян активно занимается также и научно-организационной деятельностью. Он работал научным секретарем, а с 1977 г. — заведует лабораторией азотистого обмена в Институте биохимии АН Армянской ССР. В 1976—1981 гг. А. В. Арутюнян состоял членом Международного нейрохимического общества, с 1982 г. является членом Секции нейробиологии Научного совета АН СССР по проблемам биохимии человека и животных. Долгие годы он успешно выполнял обязанности ученого секретаря Армянского отделения Всесоюзного биохимического общества АН СССР, а в настоящее время входит в состав его Правления.

А. В. Арутюнян, будучи заместителем главного редактора журнала «Нейрохимия» со дня его основания, вносит значительный вклад в работу редколлегии журнала. Он снискал уважение и признательность коллег по работе своей высокой эрудированностью, принципиальностью, доброжелательностью и трудолюбием.

Редколлегия сердечно поздравляет Александра Вартавановича Арутюняна с 50-летием со дня рождения и желает ему дальнейших творческих успехов.

РЕДКОЛЛЕГИЯ.

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., значащих на машинке через 2 интервала. Объем обзоров 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 выполненные тушью на плотной белой бумаге или кальке, представляются в конверте в двух, а фотографии в трех экземплярах. На обороте каждого рисунка карандашом следует указать фамилии авторов, сокращенное название статьи и порядковый номер, для фотографий (на глянцевой бумаге) следует указать ее верх и низ. Подписи к рисункам и фотографиям представляются на отдельном листе. Замена фотоиллюстраций электрофоретических исследований рисованными схемами не допускается. Количество иллюстративного материала (таблицы и рисунки) не должно превышать в статьях 8, в кратких сообщениях—2.

5. Формулы и индексы должны быть написаны четко черными чернилами или пастой, обязательно выделяя курсив (подчеркнуть полнотой линии) 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

Шеланов А. Ю., Мирошниченко И. И., Кудрин В. С., Расветский К. С. Влияние L-3, 4-диоксибензилаланина на гидроксирование тирозина и содержание биогенных аминов и их метаболитов в синаптических везикулах полосатого тела мозга крысы	323
Пасыпанова Г. А., Голубева Е. Е., Комратова А. Д., Суворов Н. Н., Своякин Е. С. Влияние серотонина на дифференцировку клеток феохромоцитомы РС12	331
Мельник В. И., Титов С. Ю., Глебов Р. Н. Кислый компартмент и латентная система ацидификации в синаптических везикулах	337
Арутюнян А. В., Гулям Э. А., Нерсисян Ц. М., Априкян Г. В., Кочарян М. Г. Влияние NAD и аденозина на захват [¹⁴ C]ГАМК синаптическими везикулами больших полушарий мозга крысы	348
Селищева А. А., Брусованик В. И., Кравцов Г. М., Козлов Ю. П., Шрагин А. С. Сопряжение фосфатидилинозитольного цикла с транспортом ионов кальция через мембрану синаптической везикулы	357
Чижовская И. В., Шифман М. И., Бабийчук Г. А. Рецептор-лигандные взаимодействия в структурах головного мозга крысы при гипотермии	368
Тигранян Р. А., Демин Н. Н., Ковалев В. Ю. Влияние длительного космического полета на содержание специфических компонентов в головном мозгу крысы	375
Копралов А. А., Тюлюшев В. И., Белик Я. В. Об участии белка S-100 в фосфорилировании белков нуклеоплазмы мозга и его наличии в рибонуклеопротеиновых частицах	382
Шароян С. Г., Абрамян К. С., Налбандян Р. М. Пептидглицин α-амидирующий монооксигеназа из гранул аденогипофиза: очистка и свойства	389
Карацкая К. Г., Овсян Г. А., Демин Ю. М., Овсян Л. М. Флуоресцентные характеристики и фосфолипидный состав хроматина головного мозга белых крыс при односторонней ганглиосимпатотомии	397
Хачатрян Г. С., Казарян А. Р., Адамян М. Х., Акопян А. А., Антосян А. А. Интенсивность пентозного цикла в мозгу при различных функциональных состояниях ЦНС и действии биологически активных веществ	405
Лиходий С. Ст., Лиходий Ст. С., Сибельдина Л. А., Семенова Н. А. Динамика уровней макроэргических фосфатов мозга во время ишемии по данным [³¹ P]ЯМР спектроскопии	415

Краткие сообщения

Скобелова Н. А., Амбарцумян Н. С., Захарян Р. А. Обнаружение транскрипции K1-gas подобных нуклеотидных последовательностей протоонкогена gas в клетках головного мозга крысы	425
Нагиев Э. Р. Обмен уридилвых и цитидилвых нуклеотидов в головном мозгу	428
Гурин В. Н., Семенова И. Н. Активность холинацетилтрансферазы и ацетилхолинэстеразы в гипоталамусе крысы при охлаждении и иммобилизации	432
Срапионян Р. М., Саакян С. А., Карапетян Р. О., Саакян Ф. М., Маркин В. А., Олабабян А. Б., Галоян А. А. О некоторых химических свойствах множественных форм нейроморфина «С»	436

Методы исследования

Чехонин В. П., Щербаков В. М., Морозов Г. В., Морковкин В. М. Двухсайтный иммуоферментный анализ специфического α ₂ -глобулина мозга на основе коллоидной хроматографии	440
--	-----

Обзоры

Буданцев А. Ю. К вопросу о везикулярном пуле аминокислотных нейротрансмиттеров	445
Даниловский М. А. Развитие взглядов на природу и функции эндогенных высокомолекулярных носителей регуляторных пептидов	456
Сурвилладзе В. Г. 2', 3'-циклопуклеотид 3'-фосфодиэстераза	467

Хроника

Александр Вартакович Арутюнян (к 50-летию со дня рождения)	477
--	-----

CONTENTS

<i>Shemanov A. Yu., Miroshnichenko I. I., Kudrin V. S., Rayevsky K. S.</i> Influence of 1-3,4-dihydroxyphenylalanine on tyrosine hydroxylation and content of biogenic amines and their metabolites in rat brain striatal synaptosomes	323
<i>Posypanova G. A., Golubeva E. E., Kondratyev A. D., Suvorov N. N., Severin E. S.</i> Effect of serotonin on differentiation of pheochromocytoma PC12 cell line	331
<i>Melnik V. I., Titov S. Yu., Glebov R. N.</i> An acidic compartment and a latent acidification system in brain synaptosomes	337
<i>Huroutuntan A. V., Gulian E. A., Nersislian Tz. M., Aprikian G. V., Kocharian M. G.</i> Effect of NAD and adenosine on the uptake of [¹⁴ C] GABA by rat brain cortex synaptosomes	348
<i>Selishcheva A. A., Brusovanik V. I., Kravtsov G. M., Schragin A. S., Kozlov Yu. P.</i> Coupling of phosphatidylinositol cycle to Ca ²⁺ transport through rat brain synaptosomal membranes	357
<i>Chizhevskaja I. V., Shtjman M. I., Babtychuk G. A.</i> Receptor-ligand interactions in rat brain structures during hypothermia	368
<i>Tigranyan R. A., Doemin N. N., Kovalev V. Yu.</i> The effect of prolonged space flight on the content of specific components in rat brain	375
<i>Kapralov A. A., Tyulenev V. I., Belik Ya. V.</i> On the participation of S-100 protein in phosphorylation of brain nucleoplasm proteins and its presence in ribonucleoprotein	382
<i>Sharoyun S. G., Abramyan K. S., Nalbandyan R. M.</i> Peptidylglycine α -amidating monooxygenase from granules of the anterior pituitary: purification and properties	389
<i>Karageoztan K. G., Hoveyan G. A., Dyomin Yu. M., Hovseptan L. M.</i> Fluorescent and phospholipid analysis of rat brain chrematine after the unilateral gangliosympathectomy	397
<i>Khachatryan G. S., Kazarian A. R., Adumian M. Ch., Akopian A. A., Antonian A. A.</i> The intensity of pentose cycle in brain under various functional conditions of CNS and under the action of biologically active substances	405
<i>Likhody S. St., Likhedy St. S., Sibeldina L. A., Semionova N. A.</i> Dynamics of cerebral metabolism during ischemia by ³¹ P-NMR spectroscopy data	415

Short communications

<i>Skobleva N. A., Humbartsumyann N. S., Zukharyun R. A.</i> Determination of transcription of <i>ras</i> protooncogene nucleotide sequences similar to K1- <i>ras</i> in rat brain cells	425
<i>Nagiev E. R.</i> Metabolism of uridine and cytidine nucleotides in the intact animals brain	428
<i>Gourin V. N., Semenyga I. N.</i> The activity of choline acetyltransferase and acetylcholine esterase in rat hypothalamus at cooling and immobilization	432
<i>Srapontan R. M., Saaktan S. A., Kurapettan R. O., Saaktan F. M., Markin V. A., Odabashian A. B., Galoyan A. A.</i> On the certain chemical properties of the multiple forms of neurohormone C ¹⁸	436

Methods

<i>Chekhonin V. P., Shcherbakov V. M., Morozov G. V., Morkovkin V. M.</i> Double-site immunoenzyme assay of brain specific α -2-globulin on the basis of the column chromatography	440
---	-----

Reviews

<i>Budantsev A. Yu.</i> On the vesicular pool of neurotransmitter amino acids . .	445
<i>Dantlovsky M. A.</i> Progress in opinions on the nature and function of the high molecular weight carriers of regulatory peptides	456
<i>Surutladze Z. G.</i> 2',3'-cyclicnucleotide-3'-phosphodiesterase	467

Chronicles

<i>Huroutunian A. V.</i> (On his 50th Birthday)	477
---	-----