

612.82

Г 531

*Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский*

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ  
БИОХИМИЯ  
СИНАПСОВ



612.82

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР 531

*Р.Н.Глебов, Г.Н.Крыжановский*

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ  
БИОХИМИЯ  
СИНАПСОВ



Москва  
«Медицина»  
1978

ИИ

ИЗДАНИЕ ОДОБРЕНО И РЕКОМЕНДОВАНО  
К ПЕЧАТИ НАУЧНО-ИЗДАТЕЛЬСКИМ  
СОВЕТОМ ПРЕЗИДИУМА АМН СССР

«Функциональная биохимия синапсов». Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский. М., «Медицина», 1978. 328 с., ил.

В книге излагаются фундаментальные проблемы функциональной биохимии синапсов: обмен медиаторов (ацетилхолин, биогенные амины, аминокислоты и пептиды), механизм их секреции, обратного захвата нервными окончаниями и постсинаптического действия; мембранная теория возбуждения и роль Na,K-насоса: аксональный ток, регуляция обмена белков, нуклеиновых кислот, липидов и биоэнергетики в синапсах при различных функциональных состояниях центральной нервной системы, при ряде форм патологии нервной системы; действие биологически активных веществ (циклические нуклеотиды и простагландины) на синаптические структуры.

Дан критический анализ состояния проблемы, изложены экспериментальные данные, полученные при помощи современных методов исследования, в том числе и на изолированных нервных окончаниях (синапсосах), синаптических пузырьках и синаптических мембранах.

В монографии рассматривается функционирование синапсов в интегральном виде — биохимическом, нейрофизиологическом и neuropathological. Книга предназначена для нейрохимиков, нейрофизиологов, neuropathologists и фармакологов.

В книге 19 таблиц, 13 схем и 27 рисунков, библиография — 216 названий.

The functional biochemistry of the synapses. Glebov R. N. and Kryzhanovskiy G. N. M., «Meditsina», 1978, 328 p., ill.

The book elucidates fundamental problems of functional synaptic biochemistry such as exchange of neurotransmitters and mechanisms secretion, connection between membrane processes and metabolism, axonal flow, regulation of metabolism within synapses at different functional states of central nervous system both normal and pathological and also effect of biological active substances on synaptic structures. There is a critical analysis of modern state of the problem in the monograph. Experimental data obtained by means of up-to-day methods of investigations including isolated nerve endings (synaptosomes), synaptic vesicles and synaptic membranes are discussed.

So far there was such monograph comprised the problem in biochemical, neurophysiological and neuropathophysiological aspects neither in the USSR nor abroad.

The book is intended for neurochemists, neurophysiologists, neuropathologists and pharmacologists and also for the students of biological and medical specialities.

59500—343  
Г 039(01)—78 44—78

## Введение

---

Разработка проблем современной нейробиологии, в том числе нейрофизиологии, нейрохимии, нейропатологии и нейрофармакологии, во многом зависит от знания синаптических процессов, которое важно для изучения интегративной деятельности центральной нервной системы (ЦНС), взаимодействия ее частей в системных реакциях различной сложности.

Сейчас уже недостаточно знать, какой медиатор в каком синапсе выделяется, хотя исследование этого вопроса и установление подробной «медиаторной топографии» ЦНС имеет огромное значение для клинической и теоретической неврологии. Недостаточным является и традиционное описание обмена медиаторов, хотя и здесь нерешенных вопросов больше, чем решенных, и дальнейшие исследования этой проблемы составляют одно из направлений изучения синапсов. На очереди решение весьма сложной задачи: представить различные стороны деятельности синапса в их взаимосвязи, определить всю совокупность событий, развертывающихся в пре- и постсинаптической частях синапса в виде цепных и разветвленных процессов со множеством обратных связей. Значительную часть входящих в эту задачу вопросов призвана решить функциональная биохимия синапсов, развивающаяся на стыке нейрохимии, нейрофизиологии и нейрофармакологии.

История исследования синапсов состоит из нескольких важных этапов.

Когда в 1897 г. Шеррингтон ввел в научный обиход термин «синапс», он имел в виду прежде всего необходимость обозначить функциональный и морфологический контакты между двумя нейронами. Представление о синапсе как о структуре, осуществляющей связи элементов в центральной и периферической нервной системе, проведение возбуждения от нейрона к нейрону, а также к железистым или мышечным клеткам, открыло широкие перспективы для нейрофизиологии, но главное — возникла необходимость в изучении синапса как специального образования. Открытие химической природы синаптической передачи, обнаружение нейромедиаторов и введение представлений о рецепторах медиаторов сделали необходимым включение биохимии в систему нейрофизиологических исследований. Создание мембранной теории возбуждения, установление постсинаптических потенциалов и их ионных механизмов, использование микрофизиологической техники потребовали широкого привлечения биофизики, которая вскоре превратилась в одно из направлений в изучении синапсов. Введение электронной микроскопии в сочетании с гистохимией позволило открыть тайну ультраструктуры и сделало реальными попытки установить структурные эквиваленты секреции медиаторов и других синаптических процессов. Изобретение в недавнее время методов выделения изолированных нервных окончаний (синаптосом), синаптических мембран и синаптических пузырьков открыло новые возможности для исследования синаптических процессов, в которых сочетанно используются методы биохимии, биофизики, электрофизиологии и электронной микроскопии.

Настоящая книга имеет своей целью осветить основные факты и представления по функциональной биохимии синапсов, накопленные в основном в последние годы. Она охватывает механизм секреции передатчиков и биохимические процессы, имеющие прямое или косвенное отношение к различным формам деятельности синапсов. Столь широкий подход продиктован упомянутыми выше особенностями разработки и состоянием проблемы. Естественно, что не все относящиеся сюда вопросы могут быть освещены в одинаковой мере. Необходимость краткого изложения привела к потере частных деталей и сделала невозможным специальный анализ противоречий между отдельными фактами и представлениями, которые зачастую не исчезают, а обостряются по мере накопления материала. Такие потери досадны, так как нередко раскрытие противоречия имеет большее значение, чем получение новых фактов, особенно если последние не устраняют это противоречие. Нам хочется напомнить слова из романа Г. Мелвилла «Моби Дик»: «...ничего законченного я не обещаю, потому что всякое дело рук человеческих, объявленное законченным, тем самым уже является делом гибели». И все же мы выбрали интегральный путь, хотя бы и потому, что в нашей отечественной литературе пока еще не су-

шествует единого, достаточно полного изложения функциональной биохимии синапсов. Мы сочтем свою задачу выполненной, если книга будет полезной для читателя, послужит стимулом для новых изысканий в нейробиологии<sup>1</sup>.

### Список сокращений

- ТМП — трансмембранный потенциал  
ВПСП и ТПСП — возбуждающий (В) и тормозящий (Т) постсинаптический потенциал  
ЛСД — диэтиламид D-лизергиновой кислоты  
СП — синаптические пузырьки  
АНС — 1-анилино-нафталин-8-сульфонат  
 $K_m$ ,  $K_{дисс}$  и  $K_{связ}$  — соответственно константы Михаэлиса, диссоциации и связывания  
 $K_i$  и  $K_s$  — константы ингибирования и седиментации  
 $[Na^+]_o$  и  $[Na^+]_i$  — вне- и внутриклеточная концентрация ионов Na соответственно  
Ионы кальция —  $Ca^{++}$ , кальций — Ca, пре-СМ и пост-СМ — пре- и постсинаптические мембраны  
НРФ — нервно-ростовой фактор  
 $\tau_{50}$  — время полужизни  
 $i_{50}$  — концентрация вещества, вызывающая 50% торможения  
МАО — моноаминоксидаза  
КОМТ — катехоламин-О-метилтрансфераза  
АДЦ-аза — аденилатциклаза  
ФДЭ — фосфодиэстераза

---

<sup>1</sup> Приносим искреннюю благодарность В. К. Луценко и А. А. Полгару за ценные замечания, Ю. Г. Сандалову, В. В. Рожанцу, В. И. Родиной, Е. В. Никушкину, Н. А. Самсоновой и О. И. Воловинской за помощь на всех этапах создания этой книги.

# ЧАСТЬ I. ОСНОВНЫЕ ПРОЦЕССЫ ОБМЕНА В СИНАПСАХ

## I. Структура и функции химических синапсов

---

### УЛЬТРАСТРУКТУРА ХИМИЧЕСКИХ СИНАПСОВ

Каждый тип нейронов ЦНС млекопитающих имеет свою морфологическую и функциональную обособленность, определяемую степенью разветвления отростков, количеством синапсов и уровнем в иерархической лестнице синаптической сети.

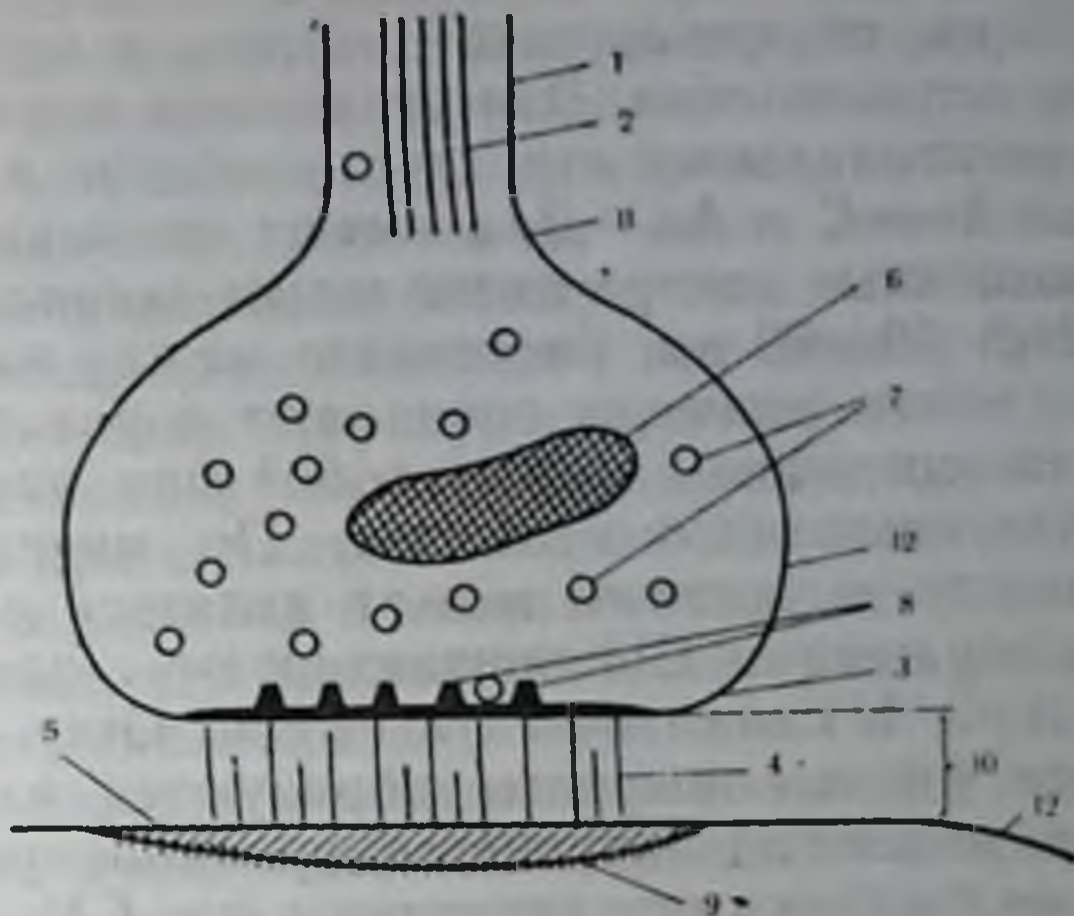
В головном и спинном мозге 60—80% всей нейрональной поверхности, включая сому, аксон и дендриты, занято синапсами. Каждый нейрон находится в контакте с множеством (до  $3-10 \cdot 10^3$ ) других клеток. Больше всего нейронов в коре головного мозга — до  $1,5 \cdot 10^{10}$  клеток. Число возможных синапсов в головном мозге человека оценивается в  $10^{13}-10^{14}$  контактов. Для коры мозга животных тело нейрона составляет 5% от его объема, глиальные клетки (глиоциты)<sup>1</sup>—5%, аксоны — 10—15%, нервные окончания и тонкие дендриты — 60%, межклеточное пространство — 12—15%. Компонентами нейрона, образующими синаптический контакт, являются аксон (А), сома (С)

---

<sup>1</sup> Названия структур мозга, клеточных элементов и органелл приведены по Международным номенклатурам (анатомической и гистологической).

Рис. 1. Ультраструктура центральных синапсов.

1 — аксон; 2 — цитоплазматические волокна (микротрубочки и нейрофиламенты); 3 — пре-СМ; 4 — внесинаптические нити; 5 — пост-СМ; 6 — синаптическая митохондрия; 7 — СП; 8 — специфические утолщения пре-СМ в области контакта; 9 — субсинаптическая зона, утолщения пост-СМ; 10 — синаптическая щель; 11 — аксональная мембрана вне области контакта; 12 — мембрана эффекторной клетки вне области контакта.



и дендриты (Д). В нервной системе различают 7 типов синапсов: А→Д, А→С, А→А, Д→Д, Д→С, С→С, С→Д. Основными, т. е. часто встречающимися, являются аксодендритические (А→Д), аксосоматические (А→С) и частично аксоаксональные (А→А) синапсы; количество последних достигает 4—10% от общего числа синапсов мозга. Таким образом, пресинаптический компонент большинства синапсов является аксональным по происхождению.

Аксон может образовывать контакт либо своими окончаниями (концевые синапсы), либо по ходу волокон (касательные синапсы). Касательные синапсы передают информацию одновременно многим нейронам и, по-видимому, служат для распространения менее специфической информации; концевые синапсы передают информацию только определенным нейронам.

Электронно-микроскопические исследования и успехи нейрхимии в 60-х годах позволили установить структурную основу функциональной асимметрии, полярности химических синапсов, объясняющую одностороннюю передачу сигнала от одного нейрона к другому. Наряду с вариабельностью некоторых компонентов синапса существуют и общие черты в ультраструктуре синапсов в разных отделах ЦНС и вегетативной нервной системы у животных, находящихся на различных ступенях филогенеза (В. П. Бабминдра, Т. А. Брагина, 1975; PETERS et al., 1972). Сходство ультраструктуры центральных синапсов отмечено не только в опытах *in situ*, но и в опытах *in vitro*, т. е. при исследовании изолированных нервных окончаний и эксплантатов культуры клеток (Kornhuber, 1974).

Различают три главных компонента ультраструктуры химических синапсов (рис. 1): пресинаптическая область, синаптическая щель и постсинаптическая область.

**Пресинаптическая область.** Эта область включает два главных морфологических признака — множество СП размером 50—



70 нм, содержащих медиаторы, и пре-СМ, имеющие специфические утолщения. Эти утолщения выявляются в форме ячеистых, гексагональных структур, особенно в центральных синапсах типа  $A \rightarrow C$  и  $A \rightarrow D$ , и имеют прерывистые плотные выросты, обращенные внутрь цитоплазмы аксонов. Высота выростов составляет 50—60 нм, расстояние между их вершинами — 80—100 нм, т. е. эти размеры совпадают с размерами СП. Плотные выросты соединены между собой при помощи тонких тяжелой электронно-плотного вещества. По мнению Akert (1971), участок между выростами может являться синаптопорой, где при возбуждении СП контактируют с пре-СМ и секретируют медиаторы в синаптическую щель. Gray и Willis (1970) полагают, что данные выросты образуются из филаментозного покрова сложных СП в процессе функционирования синапсов. Отмеченные особенности структуры пре-СМ характерны для центральных и некоторых периферических синапсов. В нервно-мышечных синапсах и в синапсах сетчатки описанные выше структуры пре-СМ отсутствуют. Толщина пре-СМ составляет в среднем 6—7 нм. Размеры нервных окончаний, например для синапсов типа  $A \rightarrow C$ , варьируют в диапазоне 0,75—1,5 мкм.

В нервных окончаниях локализованы и другие структуры, число которых в разных синапсах различно: 1) синаптические митохондрии (диаметр 0,2 мкм); 2) гранулы гликогена (диаметр 20—40 нм); 3) лизосомоподобные гранулы — гетерогенные сферические структуры с мелкозернистым содержимым, толщина мембран их 5—6 нм; 4) филаментозные прерывистые фрагменты толщиной до 75 нм (обрывки нейрофиламентов, а также в меньшей степени фрагменты незернистой цитоплазматической сети). Нередко филаментозные структуры примыкают к СП или к зоне контакта пре-СМ. Для рецепторных клеток сетчатки в терминалях также обнаруживаются плотные структуры в виде палочек, ориентированных перпендикулярно пре-СМ. Недавно в терминалях центральных синапсов описана новая структура — филаментозные косички (Chan-Palay, 1974), имеющая размеры до 80—100 нм и состоящая из 2—3 тяжей, в состав каждой из которых входят две переплетенные между собой спиралевидные филаментозные нити диаметром 6 нм. Предполагается, что в покое эти структуры, расположенные параллельно пре-СМ (на расстоянии 30 нм), служат барьером при взаимодействии СП с пре-СМ, а при возбуждении могут обратимо диссоциировать на субъединицы и тем самым способствовать комплементарному взаимодействию.

**Синаптическая щель.** Для центральных синапсов ширина щели составляет 20—40 нм, а для нервно-мышечных синапсов — 50—100 нм. Расстояние между клеточными мембранами нейронов (без образования функционального контакта) равно 10—15 нм. В центральных и периферических синапсах в синаптической щели обнаружены внесинаптические филаментозные нити

(мостики), состоящие из плотного вещества с более или менее упорядоченной гранулярной структурой. Эти нити диаметром 5—7 нм ориентированы в продольном направлении, некоторые из них, не достигающие противоположной мембраны, заканчиваются на полпути небольшими утолщениями. Число таких нитей в щели доходит до 20, расстояние между ними — 16,5 нм. Как правило, внесинаптические нити соединяют пре- и пост-СМ<sup>1</sup>. Предполагается, что за счет этих структур осуществляется ускоренная диффузия медиаторов к пост-СМ, микропиноцитоз и химическая специфичность при синаптогенезе, ослабляется диффузия медиаторов и других веществ в межклеточное пространство. Интересна точка зрения, что внесинаптические нити могут регулировать эффективность синаптической передачи (Н. С. Косицын, 1974): в состоянии покоя эти мостики расположены хаотично в щели и затрудняют диффузию медиаторов, которая при возбуждении облегчается благодаря переориентации нитей, вызванной изменением поверхностного заряда этих структур. Koguth (1974) на основании опытов по разрушению структуры изолированного синаптического комплекса цитохалазином В считает, что действие медиаторов на рецепторы пост-СМ опосредовано через сократительные структуры синаптического комплекса, в том числе через филаменты внесинаптических нитей. Нередко в синаптической щели обнаруживается гранулярный электронно-плотный материал (диаметр 0,2—0,4 нм), группирующийся в 1—2 слоя возле пост-СМ. В этом случае межсинаптические мостики не обнаруживаются.

Содержимое синаптической щели обладает свойствами полисахаридного геля, в состав которого, очевидно, входят гликозаминогликаны. Гистохимически в составе щели обнаружена арилэстераза (Csillik, Kugihár, 1968). Синаптическая щель имеет выход и во внеклеточное пространство. Диаметр щели неравномерен и местами составляет 4—6 нм, здесь и возможна прямая и обратная электрическая передача импульсов. Электрические синапсы эволюционно более ранние, чем химические, встречаются в нервной системе беспозвоночных, реже — у низших позвоночных и совсем редко — у высших позвоночных. Эти электротонические синапсы характеризуются отсутствием синаптической задержки в проведении импульса, морфологических особенностей в области контакта (отсутствие СП и синаптической щели); наличием симметричного контакта ( $\leq 2$  нм) в зоне тесного соприкосновения мембран, где нередко обнаруживаются каналы шириной до 2 нм, которые располагаются на расстоянии 8 нм друг от друга, образуя как бы пчелиные соты (Pegacchia, 1973). Активная зона указанных контактов состав-

---

<sup>1</sup> По-видимому, наличие именно этих структур объясняет тот факт, что выделяемые синаптосомы содержат обрывки пост-СМ с сохранным контактом.

ляет 15 нм. Функция обнаруженных каналов двоякая: во-первых, они обеспечивают проход низкомолекулярных веществ из цитоплазмы одной клетки в цитоплазму другой, во-вторых, создают участки с довольно низким сопротивлением.

**Постсинаптическая область.** Главным морфологическим признаком постсинаптической области является своеобразное утолщение пост-СМ с субсинаптической сетью. Пост-СМ в центральных синапсах содержит, как правило, плотный волокнистый материал в области контакта в виде слабо зернистой сети, распространяющейся на глубину до 100 нм. Эта сеть имитирует утолщение пост-СМ. Постепенное истончение сети нередко прерывается новым ее уплотнением на расстоянии 50—60 нм от пост-СМ. Структура пост-СМ в различных синапсах может варьировать, что позволяет классифицировать синапсы на симметричные и асимметричные по сравнению со структурой пре-СМ. К структурам, примыкающим к пост-СМ, относят: 1) митохондрии, чаще всего в синапсах типа А→Д; 2) глыбки базофильного вещества (тельца Ниссля) — зернистая сеть с системой полисом — рибосом, чаще всего в синапсах типа Д→С; 3) субсинаптические плотные тельца (полоски), локализованные в гексагональном порядке вблизи пост-СМ; 4) многопузырчатые тельца (лизосомные гранулы), а также, чаще всего в синапсах типа А→Д, слой уплощенных вакуолей; 5) фрагменты микротрубочек, контактирующие с субсинаптической сетью (Westrum, Gray, 1976). Характерны для постсинаптической области микроиноцитозные структуры. Система филаментов, имплантированная на внутренней стороне пост-СМ в виде идущих внутрь субсинаптических утолщений, образует субсинаптические цистерны (диаметр до 8 нм). Эти цистерны неоднородны в различных синапсах и в каждом отдельном синапсе, они могут проникать в цитоплазму на различные расстояния. В постсинаптической области синапсов типа А→Д и А→С отсутствуют структуры, подобные СП.

**Активная зона синапсов.** Область непосредственного контакта терминали, т. е. пресинаптической структуры с постсинаптической клеткой, составляет активную зону синапсов (Counteaux, 1961). Пре- и пост-СМ в области активной зоны толще, чем во внесинаптической области; например, пре-СМ в области контакта имеет толщину 7,5—8 нм. Размеры активной зоны (вдоль мембран) могут достигать 50 мкм. Активная зона нередко отличается повышенной плотностью распределения СП вблизи пре-СМ. Таким образом, активная зона синапсов является местом, где происходят секреция медиаторов и избирательное изменение проницаемости пост-СМ. Как правило, размер этой зоны убывает в ряду синапсов типа  $(A \rightarrow D) > (A \rightarrow C) > (A \rightarrow A)$ . С увеличением площади активной зоны синапса возрастает эффективность синаптической передачи. В ЦНС часто встречаются множественные контакты в активной зоне си-

напсов типа А→С и особенно типа А→Д. У таких синапсов, где число специфических утолщений в пре- и пост-СМ в одном и том же синапсе может достигать 10, возможна большая продолжительность синаптической передачи по сравнению с такой у синапсов с одним сплошным утолщением синаптических мембран аналогичной площади. Своеобразна структура активной зоны касательных синапсов типа Д→Д в пирамидальных клетках коры, имеющих в области пост-СМ шипиковый аппарат — боковые утолщения, выросты дендритов. Предполагается, что шипики вблизи тела нейронов отвечают за прием информации от тысяч других нейронов, а шипики в разветвленных дендритах (~20 шипиков на 10 мкм<sup>2</sup> поверхности) осуществляют сортировку и интеграцию поступающей информации.

Рассмотренная выше ультраструктура химических синапсов характерна для центральных и периферических синапсов млекопитающих. Активная зона нервно-мышечных синапсов имеет свои характерные особенности (Г. Н. Крыжановский и др., 1975): 1) отсутствие выступов в пре-СМ; 2) большая равномерная щель, в которой отсутствуют внесинаптические нити; 3) пре- и пост-СМ иногда разделены в центре щели фиброзным слоем (базальной мембраной); 4) обилие глубоких складок в пост-СМ, т. е. в мышечном волокне в области контакта; 5) наличие на внутренней стороне пре-СМ утолщений в форме упорядоченно встроенных частиц диаметром до 10 нм; 6) большие размеры терминалей. Некоторые отклонения от универсальной структуры синапсов, особенно ее активной зоны, обнаруживаются в синапсах нервной системы беспозвоночных.

## ОБЩАЯ СХЕМА СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

Основные этапы синаптической передачи и кругооборота медиаторов представляются следующим образом (Katz, 1968; см. Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский, 1975, 1976): приход нервного импульса по аксону, деполяризация мембран и изменение ионных токов пре-СМ, вход Са<sup>++</sup> внутрь терминалей; регуляция Са<sup>++</sup> контакта СП с комплементарными участками пре-СМ и как следствие этого экзоцитоз, т. е. секреция медиаторов в синаптическую щель; диффузия передатчика к пост-СМ и реакция с соответствующим рецептором; изменение ионных токов в области хемочувствительной пост-СМ, образование постсинаптического потенциала и последующая генерация потенциала действия; изменение обмена в эффекторной клетке; инактивация отработанного медиатора (диффузия, инактивация ферментами, обратный захват терминалью); репаративные изменения обмена в нервных окончаниях для возобновления секреции медиаторов при повторной импульсации (синтез медиаторов, их депонирование в СП и т. д.).

Таким образом, электрический сигнал-информация, достигая терминалей, индуцирует секрецию химического посредника, который преодолевает барьер — синаптическую щель и, реагируя с рецепторами пост-СМ, передает (усиливая) сигнальную информацию другой клетке.

**Критерии отбора медиаторов.** Нейроны, секретирующие в ответ на возбуждение тот или иной медиатор, называют медиаторергическими нейронами (терминология введена Dale еще в 1933 г.). Медиатор (синаптический передатчик, нейротрансмиттер) — это физиологически активное вещество, находящееся в нервной клетке в связанной форме, которое секретируется из возбужденного нервного окончания в синаптическую щель и специфически действует на рецепторы постсинаптической клетки-мишени, при этом рецепторы находятся в области иннервации, т. е. достаточно близко. Физиологически активные секретирующие вещества, которые доносятся до мишени, лишенной иннервации, т. е. синаптического контакта, током крови (или гемолимфы), принято называть гормонами. Медиаторы проявляют биологическую активность в очень низкой концентрации и только в свободной форме. В настоящее время насчитывают более 10 медиаторов. Все обнаруженные медиаторы имеют сходную биохимическую родословную, являются либо аминокислотами (ГАМК, глутаминовая кислота, глицин, таурин и, возможно, пролин), либо низкомолекулярными пептидами или синтезируются из аминокислот (ацетилхолин из серина, гистамин из гистидина, норадреналин и дофамин из тирозина, серотонин из триптофана). Возможно, этот факт указывает на эволюционный путь возникновения медиаторных систем. Все известные медиаторы практически не поступают из кровотока в мозг, т. е. гематоэнцефалический барьер препятствует проникновению извне тех веществ, которые в процессе эволюции приобрели важную биологическую роль в функции мозга. Предшественники медиаторов достаточно легко проходят в мозг. Например, для серотонина — это 5-окситриптофан, для норадреналина и дофамина — тирозин и ДОФА, для ГАМК и глутаминовой кислоты — глюкоза и глутамин. Для медиаторов характерна большая скорость кругооборота в нервной системе, все они действуют кратковременно, в ограниченном пространстве и на незначительном расстоянии. Медиаторы реакционноспособны и лабильны, неравномерно распределены в разных отделах мозга и периферической нервной системе.

Критерии отбора медиаторов, по Д. А. Сахарову (1974) и Wegman (1972), следующие: 1) избирательная локализация медиаторов в нервном окончании, где они депонированы, связаны в СП; 2) присутствие в нервных окончаниях ферментов, участвующих в синтезе и распаде медиаторов; 3) кальцийзависимая секреция медиатора (и, возможно, веществ, связывающих медиатор в СП) из нервных окончаний при их деполяризации

(пресинаптической стимуляции) в количестве, соответствующем количеству стимулов; 4) идентичность действия низких концентраций экзогенного медиатора (аппликация, микроионофорез) и естественного эндогенного передатчика на рецепторы пост-СМ, тестируемая по образованию ВПСР или ТПСР либо по изменению ионной проницаемости пост-СМ; 5) фармакологические агенты (литические или миметические средства), действующие на рецептор пост-СМ, должны блокировать либо соответственно воспроизводить эффекты предполагаемого передатчика при их искусственном добавлении в область пост-СМ; 6) наличие высокоизбирательной системы активного захвата медиатора в соответствующие терминали. Ингибиторы захвата должны потенцировать постсинаптический эффект при деполяризации нервных окончаний.

Указанные критерии необходимо использовать комплексно. Наиболее важными из них, несмотря на большую экспериментальную сложность применения, являются так называемый критерий секретиремости и критерий идентичности действия. Следует признать ошибочными критерии локализации инактивирующего фермента в пост-СМ и критерий высокой чувствительности пост-СМ к медиатору в период хронической денервации, так как они приложимы в основном к ацетилхолину.

**Возбуждающие и тормозящие медиаторы.** Медиаторы вызывают различные эффекты при взаимодействии с пост-СМ: либо возбуждение (деполяризация), либо торможение (гиперполяризация). Каждый тип постсинаптической реакции обусловлен специфическим изменением ионных потоков. Таким образом, исходя из синаптического знака действия, условились подразделять медиаторы на возбуждающие и тормозящие. Некоторые исследователи, учитывая различия в ультраструктуре некоторых синапсов (диаметр щели, тип синапсов, наличие субсинаптической сети и утолщений пост-СМ, протяженность активной зоны, наличие внесинаптических нитей в щели), пытаются создать классификацию синапсов на основании их возбуждающей или тормозящей функции (табл. 1). Такая попытка, по-видимому, беспочвенна, потому что знак синаптического действия медиаторов определяется молекулярной природой рецептора пост-СМ. Поэтому многие медиаторы в разных структурах могут выполнять как возбуждающую, так и тормозящую функцию (табл. 2). Различия ультраструктуры синапсов типа  $A \rightarrow C$ ,  $A \rightarrow D$ , как и других типов, также не абсолютны (Н. Н. Боголепов, 1975). Утверждение Uchizono (1972), что терминали, секретирующие тормозной медиатор ГАМК или глицин, содержат уплощенные СП, в настоящее время считается сомнительным. Таким образом, структура нервных окончаний не предопределяет характера действия медиатора на пост-СМ.

Большинство медиаторов амбивалентно по своему синаптическому действию, лишь некоторые из них выполняют в основ-

## Классификация структуры синапсов с возбуждающей или тормозящей функцией

Характеристика синапсов	Возбуждающий синапс	Тормозящий синапс
Форма СП	Сферондная, эллиптическая	Эллиптическая, уплощенная
Диаметр синаптической щели	30 нм	20 нм
Тип синапсов	Преимущественно аксо-дендритические (А→Д)	Преимущественно А→→С, А→А (пресинаптическое торможение), Д→Д (шипиковый аппарат), частично А→Д в мозжечке
Наличие субсинаптической сети и утолщений пост-СМ	Есть. Асимметричность структуры, чаще всего сплошные утолщения	Нет (или не очень разветвленная). Симметричность структуры, уплотнения чаще всего ограничены небольшими участками
Протяженность активной зоны	Большая	Малая
Наличие внесинаптических нитей в щели	Есть, электронно-плотный материал расположен ближе всего к пост-СМ и представляется прерывистым, имеются расширения щели	Нет (?), нет расширения щели
Локализация СП	Только в пресинаптической части, т. е. в нервном окончании. Односторонняя проводимость	Иногда (А→А, Д→Д) в обеих частях синапсов
Действие на пост-СМ	Деполаризация, образование ВПСР (от -70 до -10 мВ), увеличение проницаемости по отношению к большим гидратированным катионам (Na <sup>+</sup> и K <sup>+</sup> )	Гиперполяризация, образование ТПСР (от -70 до -80 мВ), увеличение проницаемости к K <sup>+</sup> и (или) Cl <sup>-</sup>

ном моновалентную функцию: ГАМК и глицин — тормозящую, а глутаминовая кислота — возбуждающую. В тканях головного мозга позвоночных ацетилхолин выполняет преимущественно возбуждающую, норадреналин — тормозящую функцию.

Постсинаптические рецепторы. Структуры нейрона, воспринимающие химическую информацию, называют медиаторреактивными (чувствительными). Идея о наличии медиаторных ре-

## Возбуждающее или тормозящее действие медиаторов

Медиатор	Возбуждающее действие	Тормозящее действие
Ацетилхолин	Глубокие слои коры мозга позвоночных, новая кора, ядра зрительного бугра (таламуса), ствол мозга, боковое коленчатое тело, центральные синапсы моллюсков, нервно-мышечные синапсы позвоночных, нейроны вегетативных ганглиев, мотонейроны спинного мозга	Полиморфные невроциты глубоких слоев коры (М-холинорецепторы), ствол мозга, хвостатое ядро, блуждающий нерв сердца позвоночных, центральные синапсы моллюсков
Дофамин	Хвостатое ядро мозга позвоночных, некоторые синапсы нервной системы моллюсков	Подкорковые ядра, полосатое тело мозга, центральные синапсы моллюсков
Серотонин	Боковое коленчатое тело мозга позвоночных, центральные синапсы моллюсков	Кора головного мозга, спинной мозг (нисходящие пути от каудального отдела продолговатого мозга)
Глицин	Некоторые нейроны гастропод	Вставочные нейроны (клетки Рэншоу) спинного мозга, сетчатое образование (ретикулярная формация) ствола мозга, нервная система моллюсков
ГАМК	—	Спинной мозг, нервно-мышечные синапсы ракообразных; мозжечок и кора мозга позвоночных
Глутаминовая кислота	ЦНС позвоночных и беспозвоночных	Кора головного мозга позвоночных, некоторые синапсы нервной системы моллюсков
Норадреналин	Подбугорная область (гипоталамус) мозга, надзрительные ядра, симпатические нервы сердца, симпатические нейроны спинного мозга, гладкие мышечные клетки (гладкие миоциты) позвоночных	Грушевидные невроциты (клетки Пуркинье) мозжечка, периферические ганглии, спинной мозг (нисходящие пути каудального отдела продолговатого мозга), гладкие миоциты позвоночных



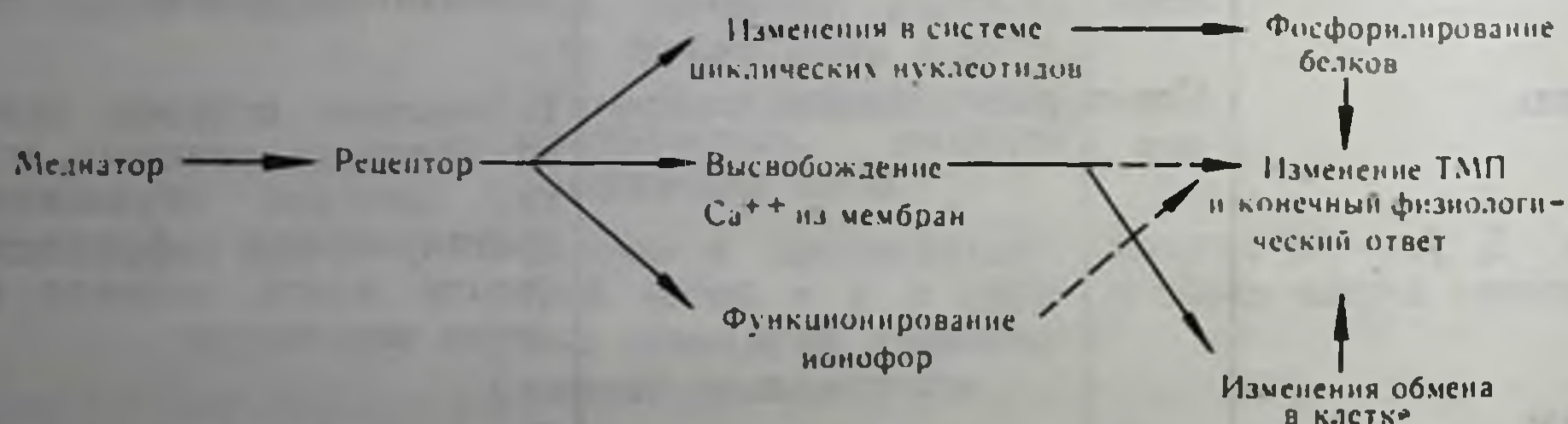
цепторов основана на данных опытов Langley, проведенных в 1905 г. (литическое действие кураре на Н-холинорецепторы мышц), и опытов Dale, поставленных в 1906 г. (литическое действие эрготамина на адренорецепторы симпатической нервной системы).

Действие медиаторов в низких дозах на химически возбудимую часть пост-СМ проявляется лишь при их нанесении на поверхность эффекторных клеток, но не внутриклеточно.

Рецепторы — это генетически детерминированные макромолекулы (белки или комплекс белка и липида), локализованные на внешней стороне пост-СМ и имеющие связывающие центры для медиаторов. Взаимодействие медиатора с рецептором пост-СМ *in situ* вызывает изменение конформации рецепторного белка, порождающее в мембране цепь обратимых событий, приводящих к изменению проницаемости мембраны, вытеснению  $Ca^{++}$  из мембран внутрь клеток, к активации системы циклических нуклеотидов, фосфорилированию мембранных белков, которые в результате ведут к изменению ТМП и физиологическому ответу.

### Схема 1

#### Постсинаптические процессы при реакции медиаторов с рецепторами



Величина конечной физиологической реакции зависит исключительно от структуры рецепторов и пропорциональна концентрации комплексов медиатор — рецептор. Число этих комплексов в свою очередь определяется не только концентрацией медиатора в синаптической щели, но и сродством рецептора к медиатору. Последнее означает, что рецепторы могут находиться как в активном, так и в пассивном состоянии. Рецептор не только «запускает» процесс, ведущий к конечной физиологической реакции, но и регулирует его интенсивность (Б. Н. Манухин, 1968).

Взаимодействие медиатора и рецептора имеет много общего с фермент-субстратным взаимодействием. Возможно, что у рецептора, как и у ферментов, имеется аллостерический центр, регулирующий сродство рецептора к медиатору. Использование кинетики обратимых ферментативных реакций для изучения

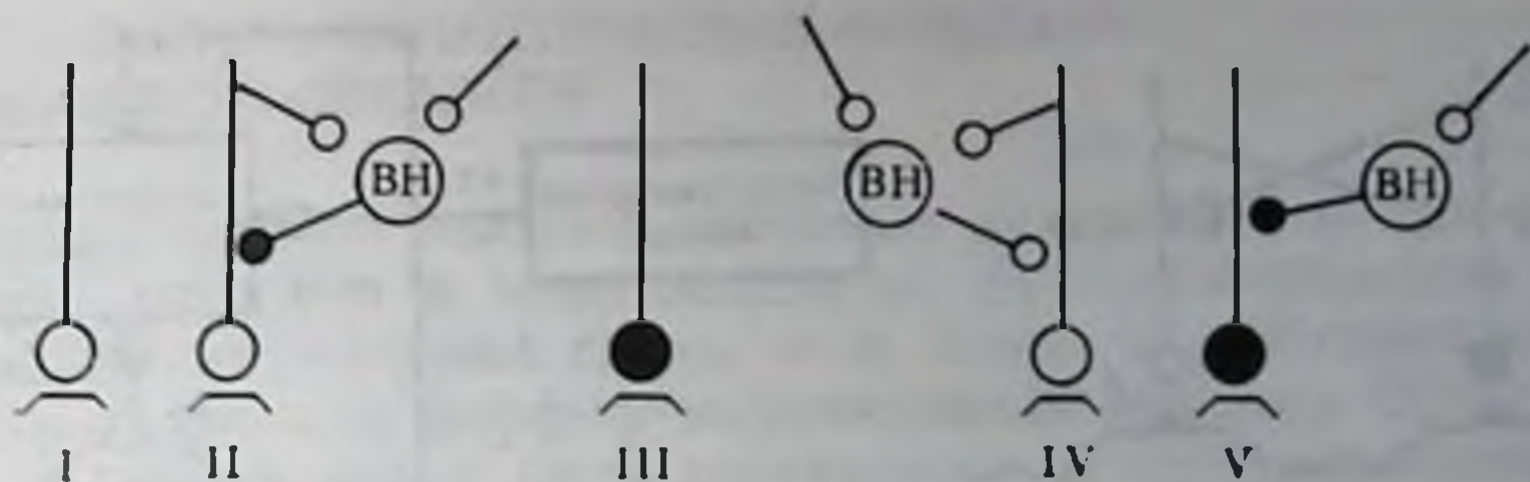


Рис. 2. Механизмы возбуждения и торможения.

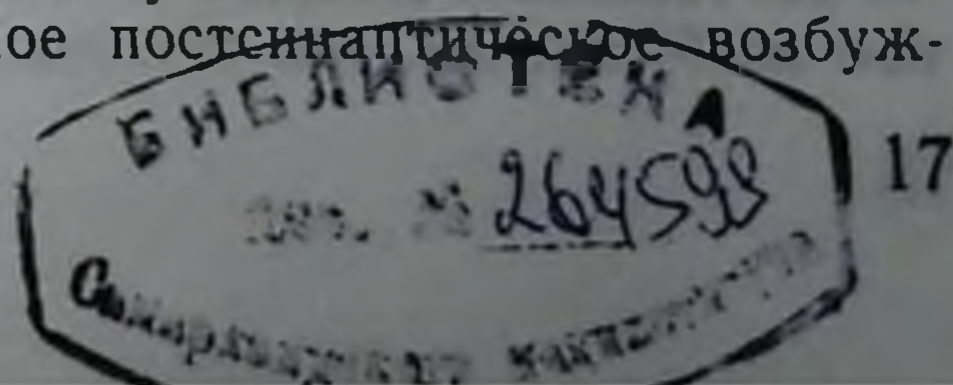
I — прямое (постсинаптическое) возбуждение; II — пресинаптическое торможение; III — прямое (постсинаптическое) торможение; IV — пресинаптическое возбуждение (облегчение); V — растормаживание. Светлые кружки — нервные окончания, секретирующие возбуждающий медиатор; черные кружки — нервные окончания, секретирующие тормозящий медиатор; ВН — вставочный нейрон.

взаимодействия медиаторов и рецепторов позволило оценить активность ряда фармакологических веществ (Т. М. Турпаев, 1958; Agiens, 1960) через величины «средства вещества к рецептору» (аналог  $K_m$ ) и «внутренней активности» (аналог максимальной скорости реакции).

Химические синапсы являются местом избирательного действия различных фармакологических агентов. Миметическими называют вещества, которые, как правило, являются структурными аналогами медиаторов, взаимодействуют с соответствующими рецепторами пост-СМ и оказывают действие, аналогичное самим медиаторам. Другими словами, миметические вещества являются агонистами медиаторов (медиаторергические вещества), иногда реагирующими с рецепторами активнее, чем сам медиатор. Литическими называют вещества, которые являются антагонистами медиаторов, как правило, конкурентно с медиатором реагируют с рецептором пост-СМ, вызывая блок синаптической передачи. Эти вещества не способны вызывать конформационные изменения, приводящие к изменению электрохимической активности пост-СМ.

Различают прямое и непрямое действие литических и миметических средств на рецепторы. К литическим средствам непрямого действия обычно относят вещества, тормозящие биосинтез медиаторов, конкурирующие с медиатором за депонирование в СП (такие вещества называют «фальшивыми» медиаторами), блокирующие механизм сопряжения деполяризации и секреции. К миметическим средствам непрямого действия причисляют вещества, ингибирующие распад медиаторов, активаторы биосинтеза медиаторов, их высвобождения из нервных окончаний, блокаторы активного захвата медиаторов терминалями.

**Механизмы возбуждения и торможения.** Механизмы возбуждения и торможения в ЦНС многообразны (рис. 2), сложны и не всегда поддаются простому анализу. Известно 4 типа синаптического возбуждения: 1) прямое постсинаптическое возбуж-



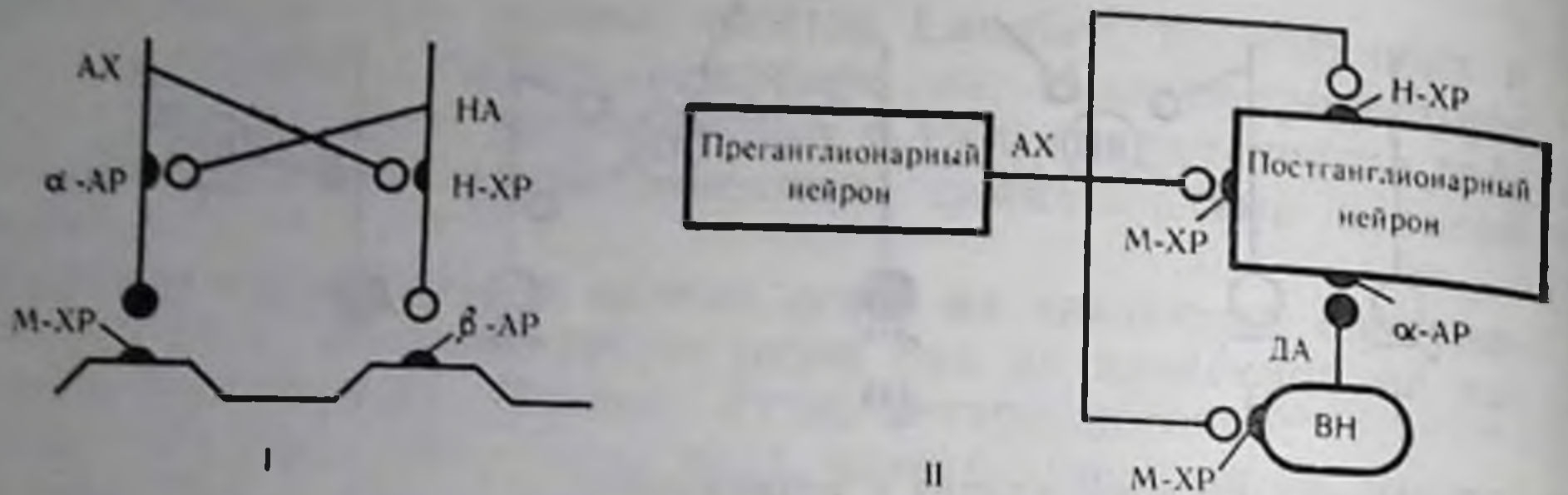


Рис. 3. Различные типы конвергенции синапсов.

ДА — дофамин; АХ — ацетилхолин; НА — норадреналин;  $\alpha$ -,  $\beta$ -АР — адренорецепторы; М-ХР — мускариновые холинорецепторы; Н-ХР — никотиновые холинорецепторы. Остальные обозначения те же, что на рис. 2.  
I — мышца сердца позвоночных; II — верхний шейный ганглий.

дение собственным медиатором; 2) усиление проведения импульса и секреции возбуждающего медиатора нервными окончаниями путем возбуждения их аксонов за счет активации третьего, вставочного, нейрона (пресинаптическое возбуждение или облегчение); 3) растормаживание (или торможение торможения), т. е. прекращение проведения импульса и секреции тормозящего медиатора нервными окончаниями путем гиперполяризации их аксонов вследствие активации тормозящего вставочного нейрона; 4) возбуждение в электрических синапсах. Известно также по крайней мере 4 типа синаптического торможения: 1) прямое постсинаптическое торможение собственным медиатором; 2) пресинаптическое торможение, т. е. прекращение проведения импульса афферентными нервами и секреции возбуждающего медиатора из нервных окончаний путем гиперполяризации их аксонов в результате активации тормозного вставочного нейрона; 3) постактивационное торможение, проявляющееся как следовая компенсаторная реакция после прекращения возбуждения; 4) торможение в электрических синапсах. Наличие указанных механизмов возбуждения и торможения свидетельствует о большой роли и распространенности касательных синапсов типа  $A \rightarrow A$  и  $D \rightarrow D$  и, кроме того, предполагает наличие в аксонах не только электрической, но и химической возбудимости.

В нервной системе очень разнообразны формы конвергенции (рис. 3) и дивергенции синапсов; в последнем случае речь идет о рассеянии синапсов коллатеральными аксонами. В основе конвергенции синапсов лежат разнообразие форм возбуждения и торможения, локализация различных рецепторов в мембране эффекторной клетки, обладающих различными порогами активации и разной чувствительностью. Известны случаи, когда в ганглиях беспозвоночных секретиромый разветвлениями аксона ацетилхолин в одной и той же эффекторной клетке вызывал как возбуждение, так и торможение (Wachtel, Kandel, 1971).

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ. ПЛАСТИЧНОСТЬ СИНАПСОВ

Синапсы обладают высокой степенью пластичности. Их свойства могут меняться в зависимости от функционирования ЦНС, изменений окружающей среды, т. е. синапсы работают как саморегулирующаяся морфофункциональная единица ЦНС. Одна часть синапсов может быть генетически детерминирована, в то время как другая, появляющаяся в онтогенезе сравнительно поздно, пластична, и именно она определяет адаптационные возможности нейрона.

Большое значение при новообразовании синапсов имеют не-синаптические рецепторы. Эти рецепторы локализованы в той области эффекторной мембраны, которая не иннервирована. Механизм выработки условного рефлекса на синаптическом уровне можно рассматривать как процесс постепенного и устойчивого (в форме «структурного следа») повышения эффективности синаптической передачи. При функциональных изменениях ЦНС (обучение, тренировки, адаптация и т. д.) могут изменяться: 1) ультраструктура синапсов (как правило, увеличение утолщений пост-СМ и количества СП в терминалях, особенно вблизи активной зоны синапсов); 2) количество пресинаптических отростков; 3) количество контактов в одном синапсе (появление множественных синапсов). Обучение (содержание крыс в насыщенных стимулами условиях внешней среды) вызывает в коре затылочной области пространственную гиперсинапсию: увеличение числа разветвлений базальных дендритов, числа и расширений дендритных шипиков, активацию ацетилхолинэстеразы (Kgesch et al., 1964). В коре зрительной области мозга крыс при обучении отмечено удлинение зоны уплотнений пост-СМ (West, Greenough, 1972).

Под эффективностью синаптической передачи понимают ряд морфологических (сужение синаптической щели, увеличение активной зоны и количества СП, разрастание терминалей и образование «новых» контактов) и биохимических (увеличение интенсивности секреции и синтеза медиаторов; увеличение чувствительности и количества рецепторов пост-СМ, проводимости возбудимых мембран вследствие возможного включения в них специальных веществ в зависимости от силы и частоты импульсации, новообразования ионселективных каналов нейрональных мембран; синтеза функционально значимых синаптических белков-антигенов, веществ-коннекторов, способствующих проторению синапсов и межклеточному узнаванию; усиление обратной связи в системе нейрон—синапс—глия; уменьшение скорости разрушения медиаторов) признаков. Такой большой список причин повышения эффективности синаптической передачи, столь важной при формировании долговременной памяти, объясняется неполнотой наших знаний.

В естественных условиях эффективность синаптической передачи очень высокая. Некоторые терминалы имеют небольшие размеры, и запас высвобождающихся квантов медиатора сравнительно невелик. Изучение ВПСП на соме мотонейрона спинного мозга указывает на то, что выделение одного кванта медиаторов приводит к постсинаптической деполяризации в среднем на 0,2 мВ (Купо, 1964). Эта величина на 2 порядка меньше, чем критическая величина, необходимая для генерации в клетке потенциала действия. Таким образом, эффективное возбуждение пост-СМ в ЦНС требует конвергенции и суммации большого количества возбуждающих и тормозящих влияний различных нервных окончаний, иннервирующих данную сомю нейрона. В сравнительно редких случаях повышение эффективности синаптической передачи в ЦНС достигается рассеянием синапсов. Например, такой вариант возможен в синапсах ползучих волокон мозжечка, оплетающих дендриты грушевидных невроцитов и в гигантских синапсах тех нейронов, которые дают начало дорсальному спинно-мозжечковому тракту. В последних амплитуда ВПСП составляет 5 мВ, т. е. действие терминалей одного аксона в этом случае примерно в  $1\frac{1}{2}$ —2 раза ниже критического уровня деполяризации.

#### ЗАКОНОМЕРНОСТИ СИНАПТОГЕНЕЗА

Существуют определенные закономерности синаптогенеза, которые Eccles (1971) определяет как «биологические принципы запрета».

Первый принцип заключается в том, что нейрон со всеми своими отростками секретирует один и тот же медиатор (принцип Дейла). Этот принцип, сформулированный еще в 30-х годах, основан на метаболическом единстве нейронов в отношении медиаторного обмена (Csillik, 1974).

Второй принцип: медиатор, выделенный терминалью определенного нейрона, всегда оказывает на одну и ту же пост-СМ одинаковое действие — либо возбуждение, либо торможение, связанное с одним из тех же ионным механизмом. Другими словами, нейрон не может быть амбивалентным по механизму своего действия на пост-СМ. Этот принцип Eccles имеет некоторую неопределенность, так как большинство медиаторов может проявлять и возбуждающее, и тормозящее действие. Второй принцип может иметь следующее определение: действие каждого медиатора на нейрон, на эффекторную клетку-мишень, т. е. знак и ионный механизм постсинаптического эффекта, определяется природой рецепторов пост-СМ, а не химической природой медиатора. Данный принцип неопределенен в толковании межклеточного узнавания, регенерации нервов, прямых и обратных связей в синапсах. По нашему мнению, уже на стадии

формирования отростков исполнительный (пресинаптический) нейрон обладает возбуждающей или тормозящей специфичностью не по медиаторному критерию, а по наличию особых узнающих молекул (назовем их «трофогены», см. главу 9), которые либо узнают при прорастании нервов свою клетку-мишень уже преформированным рецептором, либо узнают мишень, способствуя образованию синаптического контакта, где в эффекторной клетке рецептор еще не стал специализированным (в этом случае рецепторы создаются лишь вследствие образования синаптического контакта). Возбуждающие и тормозящие синапсы биохимически обособлены в том смысле, что работавший ранее синапс по принципу возбуждения не может превратиться при функционировании нервной системы в тормозящий.

Генетическая разнородность нейронов обособила и определенный тип медиаторной специфичности (ферменты синтеза или распада медиаторов, их специфику депонирования в СП, специфический механизм реутилизации медиаторов из внеклеточной среды). Множественное происхождение нейронов (полигенез), по мнению Д. А. Сахарова (1974), является главной причиной разнообразия медиаторных механизмов. Согласно его гипотезе, нейроны с одинаковым медиаторным обменом (достаточно консервативным самим по себе) имеют универсальную распространенность у животных, находящихся на различных ступенях филогенетического развития. Действительно, в простых нервных системах (моллюски, кишечнополостные) обнаружены нейроны с разной медиаторной специфичностью. Из гипотезы полигенеза следует, что: 1) нервные клетки развиваются из разных тканевых источников; 2) нейроны, имеющие одинаковый тип обмена, по-видимому, различаются в функциональном отношении.

**Онтогенез и синапсы.** Развитие синапсов в эмбриогенезе мозга позвоночных совпадает с возникновением биоэлектрической активности. При постнатальном онтогенезе происходит рост аксонов, дендритов и их ветвлений и формирование разветвленной синаптической сети, что совпадает с резким усилением биоэлектрической активности мозга. В онтогенезе синапсы типа А→С появляются в ЦНС раньше синапсов типа А→Д. В первую очередь формируются возбуждающие синапсы, а тормозящие синапсы появляются на более поздних стадиях развития (Vodjan, 1969). В филогенезе дифференциация тормозящих путей в ЦНС также развивается позже, чем становление возбуждающих путей (Eccles, 1971). Основной путь развития синапсы проходят в постнатальном онтогенезе. У новорожденных крыс в коре головного мозга отсутствуют уплотнения и характерные выросты в пре-СМ; эти выросты появляются только спустя несколько дней после рождения, располагаются на вершинах гексагональных структур пре-СМ (Aghajanian, Bloom, 1967). Подрастающие к нейронам мозга аксоны образуют с ними недифференцированные симметричные контакты типа десмосом.

В терминалях отмечается незначительное количество различных по форме СП, которые затем трансформируются в типичные СП. Вначале СП не имеют тенденции скапливаться у пре-СМ и диффузно распределены в цитоплазме нервного окончания. В ходе постнатального развития наблюдается увеличение активной зоны синапсов, утолщений пре- и пост-СМ, причем утолщения в пост-СМ преобладают, и вскоре синаптический контакт приобретает асимметричный вид. В дальнейшем значительно возрастает количество СП в терминалях и вблизи утолщений пре-СМ. Другой особенностью является появление в синаптической щели внесинаптических нитей. У крыс к 14-му дню после рождения ультраструктура синапсов коры мозга становится сходной с таковой у половозрелых животных.

По данным Н. Н. Боголепова (1975), рано созревающие синапсы, как правило, стабильны, а формирующиеся в онтогенезе — более изменчивы.

Отмеченные выше закономерности синаптогенеза *in situ* проявляются и при исследовании структуры синаптосом мозга молодых и взрослых животных. Так, на 2-й день после рождения крыс из коры мозга выделяется очень мало синаптосом, при этом до 9-го дня не заметно утолщений в пост-СМ во фракции синаптосом (Jones, Revell, 1970). В синаптосомах коры мозга однодневных крыс не обнаруживаются синаптических контактов. На 8-й день после рождения синаптосомы становятся плотными (утолщение пре-СМ, накопление СП), а на 18-й день они морфологически не отличаются от таковых у взрослых крыс (Gopatas et al., 1971). Раньше всего созревают нехолинергические синаптосомы (Негвопен et al., 1974).

## ВЫДЕЛЕНИЕ СИНАПТОСОМ

Созданные Whittaker (1965) и de Robertis (1965) методы получения изолированных оторванных нервных окончаний (синаптосом) послужили мощным импульсом в развитии нейрохимии и биохимии синапсов. Синаптосомы представляют собой мембранно-замкнутую структуру с сохраненной цитоплазмой нервных окончаний, включая СП и митохондрии. В синаптосомах содержится до 5—10% обрывков пост-СМ, что указывает на прочность синаптического контакта. В процессе гомогенизации нервной ткани (изоосмотическая среда; 0,32 М сахароза, рН 7,4; зазор в гомогенизаторе составляет 250 мкм, скорость не более 1000 об/мин, при меньшем клиренсе (80—150 мкм, скорость равна  $2—2,5 \cdot 10^3$  об/мин) нервные окончания отрываются от аксона вместе с активной зоной синапсов. Мембранная оболочка нервных окончаний в месте отрыва замыкается, герметизируя содержимое. Таким образом, ультраструктура нервных окончаний сохраняется в синаптосомах. При фракционировании (рис. 4, 5) большая часть (до 90%) синаптосом попадает вместе

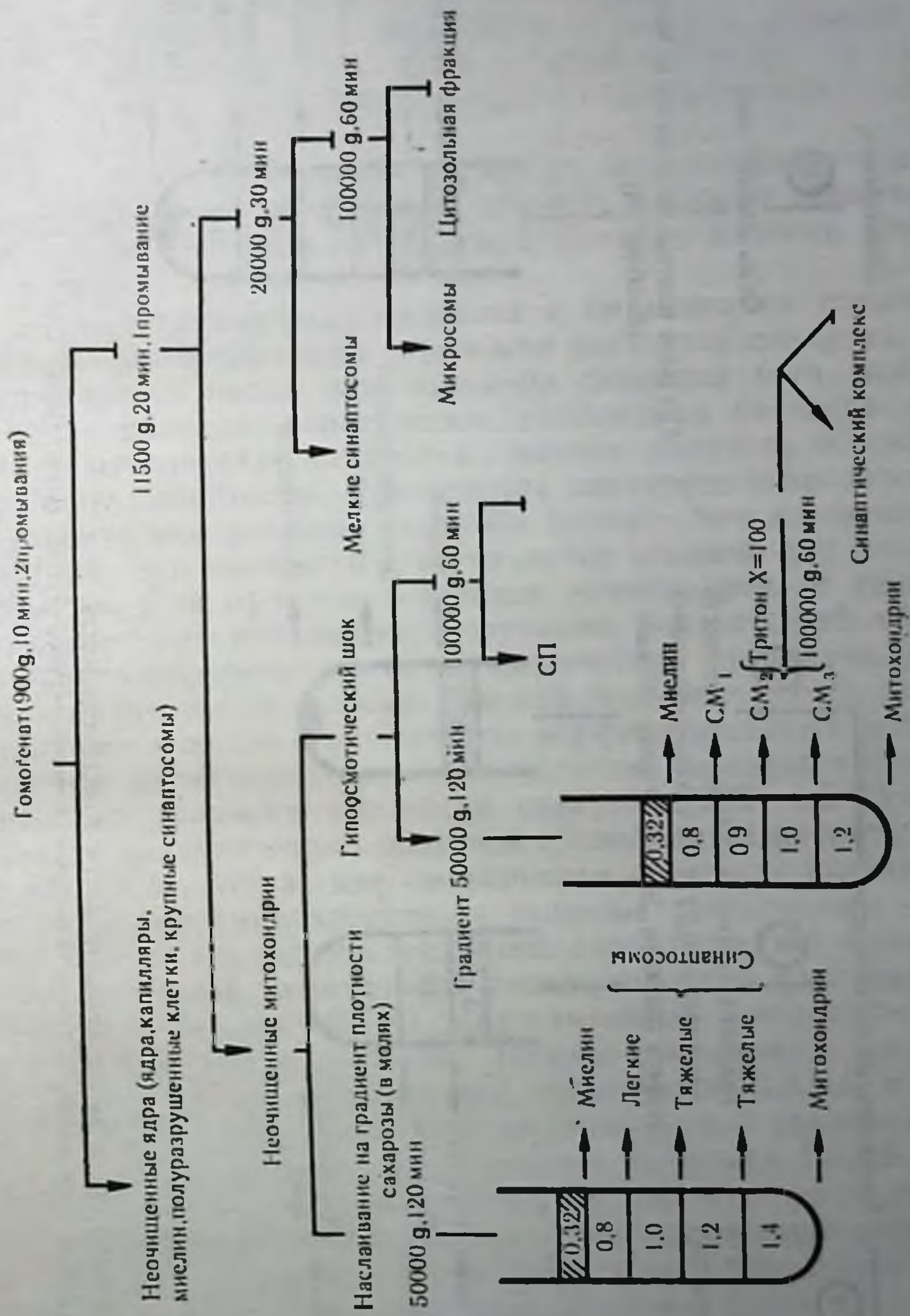


Рис. 4. Фракционирование гомогената мозга (по de Robertis, 1971).



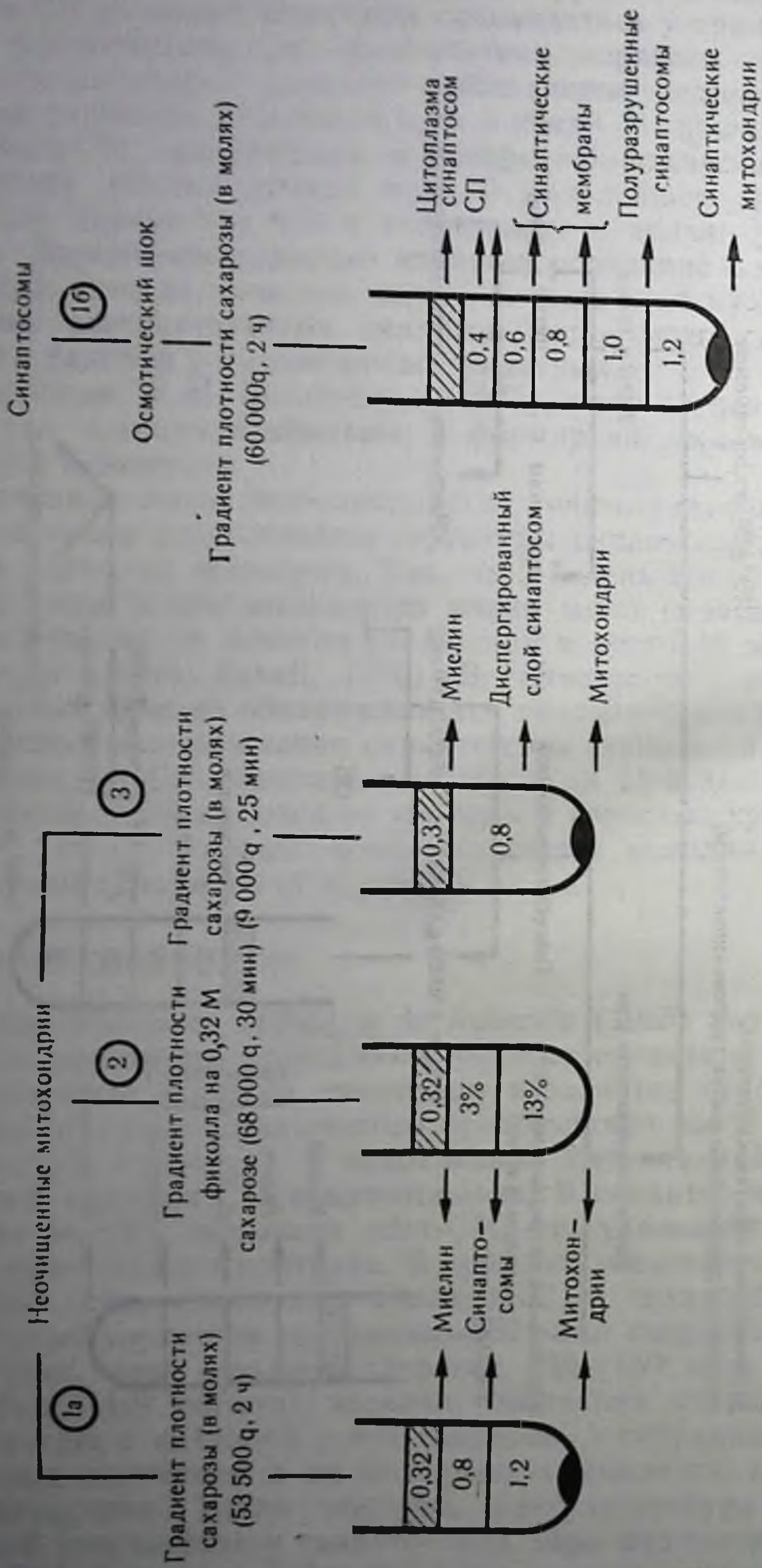


Рис. 5. Другие способы фракционирования гомогената мозга.

1a, 1б — по Whittaker (1965); 2 — по Кугокава с соавт. (1965); 3 — по Hajos (1975).

с обрывками миелина во фракцию неочищенных митохондрий. при этом содержание синапсом бывает высоким (45—55%). Выяснилось, что популяция синапсом в этой фракции в среднем имеет размеры 0,7—1 мкм, мелкие синапсомы ( $\leq 0,2—0,3$  мкм) при фракционировании выделяются в составе тяжелых микросом, а гигантские синапсомы (10—20 мкм), в частности из коры мозжечка, — в составе фракции ядер. Преимущественно выделяются аксосоматические и в меньшей степени аксодендритические изолированные нервные окончания.

Наряду с оторванными нервными окончаниями от демиелинизированных аксонов можно отделить короткие обрывки аксонов в виде обогащенной фракции (Lemkey-Johnson, Derikmenjian, 1970).

Используя центрифугирование с применением горизонтального ротора в градиенте плотности растворов сахарозы и CsCl силиконового масла или полимера сахарозы (отн. мол. м до  $5 \cdot 10^5$ ) — фиколла, образующего коллоидные растворы с нулевым осмотическим давлением, можно получать обогащенную фракцию синапсом. Равновесная плотность синапсом в гипертоническом растворе сахарозы меньше, чем плотность митохондрий. Это обстоятельство является основой для разделения фракций. Для лучшего отделения митохондрий от синапсом гомогенат или неочищенную фракцию митохондрий обрабатывают йоднитротетразолием в присутствии сукцината. Популяции синапсом из разных отделов головного мозга животных отличаются седиментационными, морфологическими и биохимическими характеристиками. Применение центрифугирования в линейном градиенте плотности сахарозы (0,32—1,5 М) и использование радиоактивных изотопов позволили установить (Wofsey et al., 1971), что легкие синапсомы содержат ацетилхолин и медиаторные аминокислоты, а тяжелые синапсомы — биогенные амины. По седиментационной характеристике синапсомы с той или иной медиаторной специфичностью располагаются в ряд: ацетилхолин > ГАМК > глутаминовая кислота > глицин > норадреналин > серотонин. Однако имеются и исключения. В полосатом теле синапсомы, содержащие ГАМК и норадреналин, по седиментационной характеристике сходны, а в подбугорной области легкие синапсомы содержат ГАМК, а тяжелые — норадреналин. В подбугорной области легче синапсомы, содержащие норадреналин, чем содержащие серотонин, в то время как в спинном мозге наблюдается обратное отношение. Доля глиальных элементов (замкнутые обрывки астроцитов) в препаратах синапсом невелика (Cotman et al., 1971). В настоящее время существуют методы выделения синапсом из мозга позвоночных и беспозвоночных; методы выделения фракции СП из мозга и периферических нервов животных. По расчетам Whittaker, большая часть нервных окончаний мозга при

гомогенизации может быть превращена в новые искусственные субклеточные частицы — синаптосомы.

Из синаптосом можно получить следующие фракции (см. рис. 4): СП, синаптические мембраны с различными седиментационными характеристиками, синаптические митохондрии, цитоплазму синаптосом и синаптические контакты, представляющие собой активную зону синапсов. Для этого подвергают гипосмотическому шоку синаптосомы (метод Уиттейкера) либо фракцию неочищенных митохондрий (метод де Робертиса). При градиентном центрифугировании основная часть СП задерживается в слое 0,3—0,4 М сахарозы, однако мелкие СП (40 нм) задерживаются в слое 0,1 М сахарозы (Ohsawa, Uchizono, 1975). Фракция СП, содержащих медиаторы, осмотически устойчива. При рН 8,0 из СП экстрагируются вещества мембран СП, а при рН 4,0 наблюдается полная потеря запасов медиатора. Дополнительную очистку фракции СП проводят либо гельфильтрацией на сефадексе Г-50, либо на ультрафильтрах. Фракция синаптических мембран в большинстве случаев представляет собой «тени» синаптосом с вымытой цитоплазмой. Из этой фракции в свою очередь обработкой 0,1% раствором тритона X-100 можно получить обогащенную фракцию синаптических контактов (см. рис. 4), которая отличается от фракции нативных синаптических мембран содержанием ганглиозидов, активностью Na, K-АТФ-азы и рецепторных протеолипидов. Введение в среду гомогенизации ткани мозга 10 мМ MgCl<sub>2</sub> (или CaCl<sub>2</sub>) увеличивает выход синаптосом, содержащих прикрепленные к активной зоне пост-СМ (Kornhuber et al., 1969). Известны методы выделения фракции синаптических контактов, дающие выход до 65% (Theglen, Mushynski, 1976), причем в этой фракции обнаружены сократительные белки — тубулин и актин. При фракционировании микросом мозга в градиенте плотности сахарозы обрывки пост-СМ локализуются в слое с плавучей плотностью 1,112 г/мл<sup>3</sup>.

По данным Cotman и соавт. (1971, 1974), синаптические контакты можно разделять на пре- и пост-СМ обработкой 3 мМ CaCl<sub>2</sub> или N-лаурил-саркозинатом. Чистоту и нативность получаемых синаптических фракций контролируют электронно-микроскопически и ферментами — маркерами субклеточных элементов [митохондрии — цитохромоксидаза, сукцинатдегидрогеназа; лизосомы — β-глюкуронидаза, кислая фосфатаза; глиоциты — холинэстераза; пластинчатый комплекс (аппарат Гольджи) — тиаминпиррофосфокиназа; микросомы — глюкозо-6-фосфатаза; нервные трубочки (микротрубочки) — тубулин; клеточные мембраны — Na, K-АТФ-аза, ацетилхолинэстераза; цитозоль — K<sup>+</sup>, лактатдегидрогеназа].

Синаптосомы при обработке детергентами, органическими растворителями, ультразвуком, при повторном замораживании — оттаивании быстро разрушаются, освобождая непрочно связанный и частично прочно связанный медиатор. Синаптосомы

менее стабильны, чем митохондрии и лизосомы, и более чувствительны к гипотоническим растворам (особенно при  $\text{pH} \leq 5,5$ ). При хранении синапсом в 0,32 М сахарозе при 0—4 °С в течение суток теряется 30% ацетилхолина. Синапсомы метаболически активны, сохраняют некоторые функции синапсов (секреция, активный и пассивный транспорт ионов, захват и депоирование медиаторов) в течение 3—4 ч при 37 °С в изотоническом растворе Кребса — Рингера и аэробных условиях (Bradford et al., 1975). Синапсомы «выживают» даже в том случае, если ткань мозга, замороженного в жидком азоте, растирают до порошка. По-видимому, цитоплазма синапсом имеет полутвердую, гелеобразную структуру, которая придает им сравнительно большую механическую прочность.

Фракция синаптических мембран является хорошим объектом для выделения различных медиаторных рецепторов. Интересно указать на предложенный Bradford (1970, 1975) метод возбуждения изолированных нервных окончаний при помощи стимуляции электрическим током: 50 пар сдвоенных прямоугольных импульсов переменной полярности, причем отрицательный импульс следует сразу за положительным; длительность — 0,4 мс, напряжение — 5 В, сила тока — 20 мА; платиновые или золотые кольцевые электроды, раствор Кребса — Рингера. Таким образом, на уровне синапсом можно исследовать корреляцию метаболизма в нервных окончаниях с их физиологической активностью. Недостатком фракции синапсом мозга является их гетерогенность по медиаторной специфичности.

Методика выделения синаптических рецепторов сходна с методами выделения и очистки ферментов. Однако если активность ферментов *in vitro* можно изучать на различных стадиях очистки, то в случае рецепторов, когда нарушена целостность мембран и клеток, физиологический ответ получить нельзя. Специфический лиганд (меченый медиатор, литическое или миметическое вещество) обычно связывают с субклеточными фракциями, содержащими рецептор, а затем отделяют специфические к лиганду белки от балластных. Трудность выделения и очистки рецепторов состоит в том, что они представлены в ткани в очень малых концентрациях ( $\leq 1\%$  от поверхности мембран) и относятся к структурным, т. е. к интегративным гидрофобным липопротеидам. Эти липопротеиды растворимы либо в органических растворителях (de Robertis et al., 1967), либо в вильных ионных детергентах в водной среде (Changeux et al., 1970).

Выделение рецептора состоит из нескольких этапов (de Robertis, 1976). Фракцию синаптических мембран или суммарный липидный экстракт инкубируют с лигандом ( $10^{-6}$ — $10^{-8}$  М), далее его разделяют методом хроматографии на органофильном геле сефадекса LH<sub>20</sub>. Элюцию проводят органическими растворителями возрастающей полярности. Быстрее всего элюируются хлороформом  $\alpha$ -адренорецептор селезенки, рецептор глутаминовой кислоты из мышц креветок, рецепторы аминокислот ЦНС, позже ГАМК-рецептор креветок.

Н-холинорецептор электрического органа ската и скелетных мышц позвоночных, М-холинорецептор гладких мышц. При последующей элюции смесью хлороформа с метанолом выделяются рецепторы ацетилхолина, норадреналина и серотонина из ЦНС.

Уже из этих опытов следует, что рецепторы для определенного медиатора в различных органах и тканях разных животных по своей структуре отличны. Можно добиться высокой степени очистки рецепторов, используя в дальнейшем метод хроматографии по сродству. Например, определенную фракцию, полученную описанным выше методом, далее сорбируют на колонке с сефадексом LN<sub>20</sub>, ковалентно связанным с каким-либо медиаторергическим веществом. Эта колонка избирательно задерживает белки рецепторов, которые потом элюируют с различными реагентами.

## 2. Взаимосвязь аксонального тока макромолекул и органелл с функцией синапсов

---

### ФУНКЦИЯ АКСОТОКА

В 1945 г. Weiss и Hiscoe открыли феномен непрерывного движения аксоплазмы (аксоток) от перикариона нейрона по его аксону, обнаружив появление наплывов аксоплазмы на проксимальной к соме нейрона стороне лигатуры периферического нерва. Этот эффект проявляется в норме и при регенерации аксона. Впоследствии наличие аксотока (и дендритного тока) установили при использовании электронной микроскопии, радиоавтографии и изотопной техники. Аксоток — универсальное явление, наблюдаемое у всех изученных видов животных, имеющих сформировавшуюся нервную систему; оно характерно как для центральных, так и периферических аксонов.

В настоящее время можно выделить следующие функции аксотока макромолекул и органелл из тела нейронов по аксону (или дендритам) в область нервных окончаний (Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский, 1976): 1) эффективная и надежная передача нервных импульсов; 2) пополнение запасов ферментов, метаболитов и органелл (например, СП), необходимых для функционирования синапсов; 3) осуществление роста отростков у нейробласта, нейронов растущего организма, регенерации нервов и пресинаптической части синапсов; 4) реализа-

ция трансинаптической передачи трофогенов (веществ, индуцирующих метаболизм в эффекторных клетках) и трофического материала (белков и полипептидов), обеспечивающего высокую степень пластичности эффекторных структур; 5) осуществление обратной связью передачи информации от синапсов (пре- и постсинаптических структур) к телу исполнительного нейрона при помощи обратного аксотока; 6) поддержание нейронов на «вечно молодом» уровне (хотя нейроны не делятся, процессы биосинтеза в них очень интенсивны).

## БЫСТРЫЙ И МЕДЛЕННЫЙ АКСОТОК

Вначале исследователи обнаруживали миграцию веществ по аксону, соизмеримую со скоростью движения аксоплазмы (0,5—5 мм/сут). Большинство работ по исследованию аксотока посвящено транспорту меченых белков и гликопротеидов.

Биохимические и прежде всего радиоавтографические кинетические исследования показали, что тела нейронов включают меченые аминокислоты значительно более интенсивно, чем аксоны. Затем происходит перераспределение интенсивности обновления белков: вновь синтезированные белки мигрируют в аксонный холмик, радиоактивность в теле нейрона уменьшается, а в дистальной части аксона она минимальна. Спустя некоторое время можно заметить вновь синтезированные белки уже в дистальной части аксона. Интенсивность синтеза белка в телах нейронов, а значит, и объем транспортируемых белков по аксону и дендритам обычно коррелируют с количеством, величиной и размером отростков нейрона. Скорость движения веществ по аксону зависит от специфики нерва, вида и возраста животных, размеров и толщины нерва. При тщательном изучении (Ochs, 1972; Jeffrey, Austin, 1973) распределения скоростей аксотока белков обнаружено два главных компонента аксотока — медленный, мало изменяющийся (0,5—5 мм/сут) и быстрый, сильно изменяющийся (10—500 мм/сут). Для быстрого аксотока суммарных белков в периферических нервах наиболее характерна скорость 200—400 мм/сут.

Большинство (70—80%) белков, значительную часть которых составляют гликопротеиды с отн. мол. м.  $18-100 \cdot 10^3$ , мигрирует с быстрым аксотоком; 40—50% белков, мигрирующих с медленным аксотоком, являются растворимыми, остальные, по-видимому, связаны с цитоплазматическими волокнами; 85% белков, движущихся с быстрым аксотоком, связаны с «текущими» органеллами, остальные являются растворимыми. Степень обновления растворимых белков в 5—10 раз выше, чем структурных. Значения  $t_{50}$  для белков, мигрирующих с медленным аксотоком, выше (8—9 сут), чем для белков, мигрирующих с

быстрым аксотоком (1—2 сут). Основным поставщиком мигрирующего материала в теле нейрона служит пластинчатый комплекс, хотя часть белков транспортируется непосредственно от рибосом в аксоплазму (Droz, 1973).

Изучение кинетики включения меченых аминокислот в нервные окончания *in vivo* (метод радиоавтографии) или в синапсомы мозга животных выявляет 2 или 3 максимума радиоактивности в зависимости от срока введения изотопов. После внутримозгового введения мышам смеси меченых аминокислот (или после введения в сетчатку) уже через 15 мин отмечается накопление метки в синапсоме, выделенных из зрительной области коры мозга (Droz, Bagondes, 1969).

Первый максимум профиля включения зафиксирован через 90 мин, второй — через 3 сут. Первый пик объясняется наличием локального синтеза белка в синапсоме (а возможно, и сверхбыстрым аксотоком), а второй — белками, переносимыми быстрым аксотоком. Аналогичный двухфазный профиль включения аминокислот получен радиоавтографически в ресничном ганглии цыплят (Koenig, Droz, 1970), при этом установлено, что 85% белков, переносимых быстрым аксотоком, связано с СП, а 15% — с белками синаптических митохондрий.

Максимум включения  $^3\text{H}$ -лейцина и  $^{14}\text{C}$ -холина (внутримозговая инъекция) соответственно в белки и фосфолипиды синапсом мозга крыс наблюдается через 2—3 ч, пурамицин тормозит оба процесса (Abdel-Latif et al., 1970). Авторы объясняют наличие первого максимума как локальным синтезом, так и частично быстрым аксотоком. Вторым максимумом включения аминокислот *in vivo* в белки синапсом показан многими исследователями. Третий максимум, связанный с медленным аксотоком, отмечается через 10—14 дней после инъекции (Austin, Morgan, 1967; Bondy, 1972). В наших исследованиях (Р. Н. Глебов, 1974) при изучении кинетики включения  $^3\text{H}$ -лизина и  $^{14}\text{C}$ -орота в субклеточные фракции коры мозга крыс установлено следующее:

- 1) перераспределение ядерного и цитоплазматического синтеза белка и РНК в течение 64 ч после внутрижелудочкового введения;

- 2) наличие первого и второго максимумов обновления белков синапсом (соответственно 1 ч и 2—3 сут);

- 3) включение  $^{14}\text{C}$ -орота в РНК синапсом лишь через 64 ч после инъекции;

- 4) интенсивность обмена белков синапсом значительно меньше таковой белков микросом, цитозоля, ядер и сравним или меньше интенсивности обмена белков фракций митохондрий и миеллина.

В опытах *in vivo* установлено, что белки субчастиц синапсом интенсивнее обновляются, чем белки цитоплазмы синапсом (Van Hunger et al., 1968). В аналогичных опытах показано



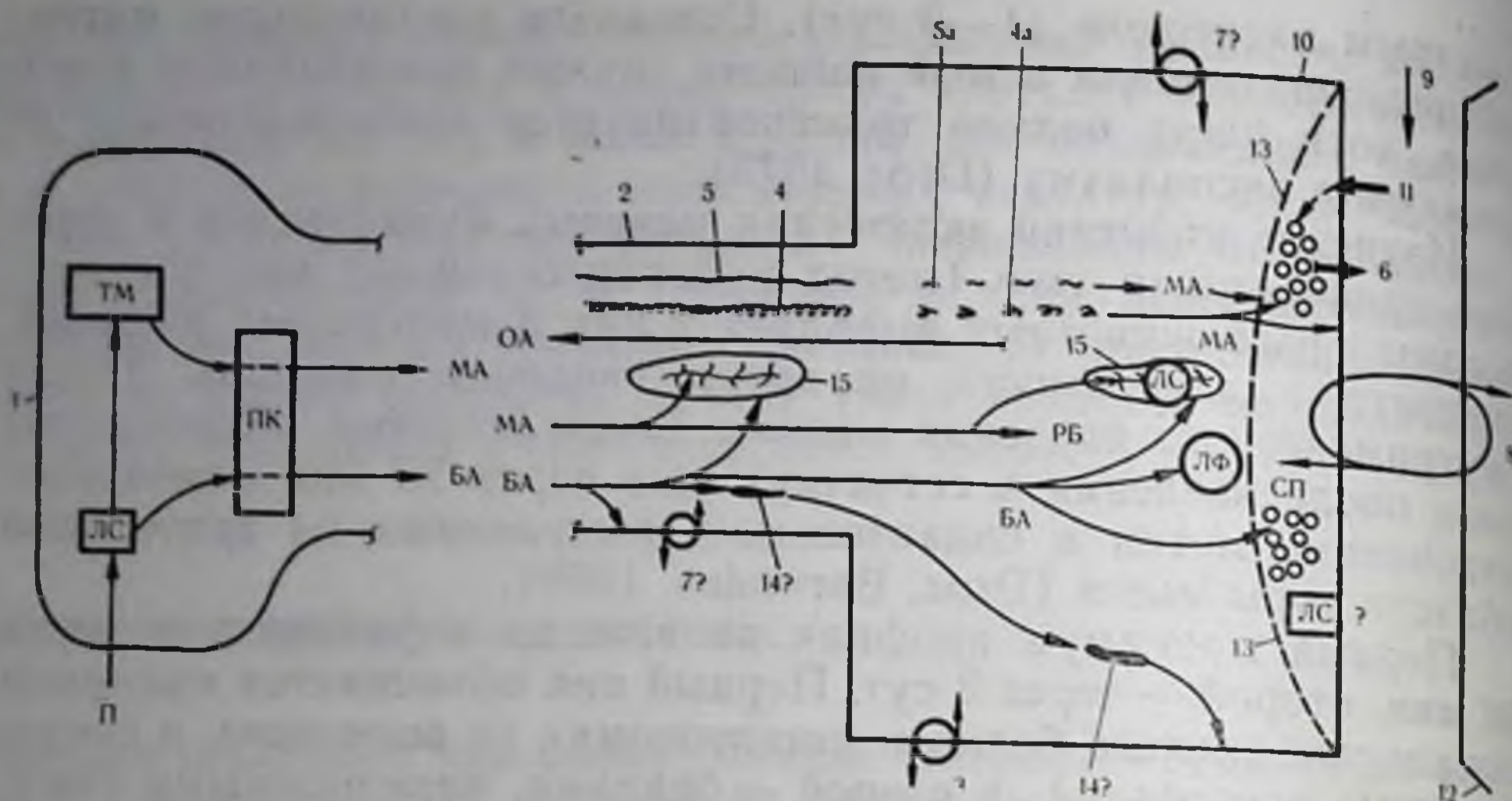


Рис. 6. Движение веществ и органелл по аксону в область нервного окончания (по Dgoz, 1973, с изменениями).

П — предшественник макромолекул, ЛС — локальный синтез; ТМ — трансформация макромолекул и их медленная утилизация; ПК — пластинчатый комплекс; БА, МА — соответственно быстрый и медленный аксоток; ОА — обратный аксоток; ЛФ — лизосомные ферменты; РБ — растворимые белки. 1 — тело нейрона; 2 — аксон; 3 — Na,K-АТФ-аза; 4 — микротрубочки; 5 — нейрофиламенты; 4а и 5а — фрагменты микротрубочек и нейрофиламентов; 6 — секреция медиаторов; 7 — обмен макромолекул в системе нейрон — нейроглия; 8 — транссинаптическая передача белков; 9 — синаптическая щель; 10 — пре-СМ; 11 — обратный захват медиаторов; 12 — пост-СМ; 13 — ограничительная пунктирная линия — активная зона синапсов; 14 — фрагменты незернистой сети; 15 — митохондрии.

также (Margolis et al., 1975), что обновление нерастворимых в тритоне X-100 гликопротеидов синапсом выше, чем растворимых.

Основная роль медленного аксотока — поставка молекул и структур, входящих в транспортную систему цитоплазматических нитей, т. е. медленный аксоток «работает» на быстрый.

Анализ ряда работ (Dgoz, 1973; Ochs, 1974), выполненных с использованием радиоавтографии и субклеточного фракционирования, позволил установить природу белков и гликопротеидов, входящих с аксотоком в состав различных пресинаптических структур в ткани мозга и периферических нервов (рис. 6). С быстрым аксотоком мигрируют органеллы (СП, митохондрии, частично лизосомы и фрагменты незернистой цитоплазматической сети), а также структурные белки, главным образом активной зоны пре-СМ, далее белки, входящие в состав СП и частично в синаптические митохондрии, микротрубочки и нейрофиламенты.

Гликопротеиды, мигрирующие с быстрым аксотоком, обнаруживаются обычно в пре-СМ и мембранах СП, в синаптоплазме их меньше. Гликозаминогликаны, липиды, нуклеотиды мигрируют с быстрым аксотоком. Установлено, что свободные ами-

нокислоты также мигрируют как с медленным, так и с быстрым аксотоком, в последнем случае в составе органелл. С быстрым аксотоком мигрирует нейроспецифический кислый сialogликопротеин GP-350 (Van Nieuw Amerongen et al., 1974), в то время как другие нейроспецифические белки (см. главу 4), такие, как белок 14-3-2 (Magangas et al., 1975) и белок S-100, мигрируют с медленным аксотоком. В блуждающем и подъязычном нервах кроликов скорость аксотока белка S-100 составляет 5—20 и 4 мм/сут соответственно (Miani et al., 1972).

С медленным аксотоком движутся в основном цитоплазматические волокна (микротрубочки и нейрофиламенты) и растворимые белки, гликопротеины, входящие в их структуры, а также растворимые белки аксоплазмы, митохондрий и частично СП и незернистой сети.

Движение веществ и структур в аксоплазме очень «оживленное». Необходимо выяснить, какие вещества и структуры не мигрируют с аксотоком. Оказалось, что к таким относятся ядерный материал, ДНК и цитоплазматические рибосомы.

В отличие от белка РНК движется диффузно, фронт ее сильно размыт, и скорость аксотока трудно определить, тем более что это осложняется собственным синтезом РНК в аксоне. По мнению Austin и соавт. (1970), исследовавших аксоток РНК в седалищном нерве цыпленка, большая часть движущейся РНК расходуется «в пути» (т. е. в самом аксоне) на процессы биосинтеза. Вместе с высокомолекулярной РНК с такой же скоростью мигрируют и ее предшественники. Часть движущейся по аксону РНК может также использоваться леммоцитами (шванновские клетки). Подобная «утечка» описана для транспортируемого по аксону зрительного тракта мозга золотой рыбки белка с отн. мол. м.  $42 \cdot 10^3$  (Elam, 1975). После введения меченых предшественников в глазное яблоко животных в зрительных трактах мозга наблюдается как медленный, так и быстрый аксоток РНК. Мигрирующая РНК входит в состав синаптических митохондрий и частично в состав пре-СМ (Van Hungen et al., 1968).

В периферических нервах с аксотоком мигрируют лизосомы. Об этом можно судить по активности кислых протеиназ, кислой фосфатазы и  $\beta$ -глюкуронидазы, содержащихся в этих органеллах. Известны морфологические и биохимические доказательства аксотока митохондрий: метка из митохондрий нейронов поступает в синаптические митохондрии. Скорость миграции митохондрий невелика: для MAO в седалищном нерве кошек она составляет 1—5 мм/сут (Khan, Ochs, 1975), для цитохромоксидазы в поджелудочном нерве морской свинки — 17 мм/сут (Banks et al., 1969). Аденилатциклаза в периферических нервах движется с быстрым аксотоком (Gray et al., 1971), а растворимый фермент лактатдегидрогеназа — с медленным аксотоком (Khan, Ochs, 1975).

Большая часть работ по аксотоку СП и ферментов обмена медиаторов посвящена норадреналину и ацетилхолину. Гистохимическим методом установлено накопление норадреналина выше лигатуры через несколько минут после наложения двойной лигатуры на седалищный нерв крысы (Dahlstrom, 1967). Количество норадреналина увеличивается быстро в течение 24 ч, а в течение последующих 3 сут — медленнее. Анализ показал, что норадреналин мигрирует с быстрым аксотоком в связанной с СП форме, а доля локального синтеза медиатора в аксонах невелика. Увеличение количества СП проксимальнее места перевязки нерва и одновременное уменьшение их количества в нервных окончаниях позволили предположить, что источником СП является тело нейрона.

Наложение лигатуры на селезеночный нерв кошки приводит к накоплению  $^{14}\text{C}$ -норадреналина проксимальнее места перевязки через 24 ч после введения. В дистальном отрезке нерва радиоактивность не регистрировалась, а количество норадреналина в окончаниях перерезанного нерва существенно не изменялось по сравнению с контролем (Geffen, Livett, 1971). Содержание норадреналина, скопившегося у лигатуры в течение 24 ч после перевязки, составляло 1% от его общего уровня в нервных окончаниях. Если бы весь медиатор поступал в терминали только с аксотоком, время его полуобновления должно было бы составить 100 сут. Учитывая, что  $t_{50}$  для норадреналина на самом деле менее суток, считается, что почти весь медиатор синтезируется непосредственно в терминалях, а поступление его с аксотоком незначительно. Морфологические исследования указывают на возможность аксотока адренергических СП в периферических нервах, преимущественно больших гранулярных везикул. Например, спустя 10 мин после наложения лигатуры на поджелудочный нерв морской свинки СП начинают скапливаться на 1 мм выше лигатуры.

Скорость аксотока норадреналина, очевидно, в составе адренергических СП (50—250 мм/сут) приблизительно совпадает со скоростью быстрого аксотока дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, локализованной в СП. Растворимые цитозольные ферменты обмена норадреналина транспортируются с медленным аксотоком, однако тирозингидроксилаза, связанная с мембранами, может мигрировать по аксону с быстрым аксотоком. Так же мигрируют гранулы, содержащие гормоны нейрогипофиза, везикулы, содержащие серотонин (Goldman, Schwartz, 1974), ГАМК (Bondy, 1971) и дофамин (McGeer et al., 1975). Очень важно, что серотонин, включенный в тело холинергических нейронов моллюска, остается свободным в цитоплазме и не транспортируется с аксотоком, что говорит о специфичности его депонирования в со-

ставе серотониновых СП. Пока не ясно, почему ацетилхолиновые СП мигрируют с медленным аксотоком (3—17 мм/сут), т. е. в несколько раз медленнее, чем адренергические СП (Häggen-dal et al., 1973). С аксотоком транспортируются белки, необходимые для хранения медиаторов в СП, такие, как нейрофизины, хромогранины (Lagercrantz, 1971). Основное количество ацетилхолинэстеразы быстро транспортируется с мембранными частицами (в составе фрагментов незернистой сети) и лишь небольшая часть — с медленным аксотоком (Dahlström et al., 1974). Удалось выявить два типа аксотока для холинацетилтрансферазы. Растворимый фермент движется в основном с медленным аксотоком (Foppim, 1967), а мембранно-связанный (может быть, в составе СП) — с быстрым (Hebb et al., 1971). Таким образом, главная функция аксотока в обмене медиаторов состоит не в пополнении их запасов, а в обеспечении ферментами их синтеза и распада, протоструктурами СП и материалом (например, хромогранины) для упаковки медиаторов в пузырьках.

#### ОБРАТНЫЙ АКСОТОК

Обратный, т. е. ретроградный, аксоток был открыт в 1963 г. Lubinska. Согласно ее данным, объем прямого аксотока превышает объем обратного. В культуре ткани двигательных нейронов дорсального корешка цыпленка доказательства двустороннего тока аксоплазмы получены путем визуального наблюдения за потоками цитоплазмы отростков, отчетливо заметными при центрифужной съемке. Скорость потоков коррелирует со скоростью роста культур, при этом можно видеть движение структурированных частиц цитоплазмы. Перевязка периферических нервов ведет к накоплению структурированных частиц по обе стороны от места сдавления, причем большему в проксимальной части. Lubinska показала также, что при перевязке нервов значительное количество ацетилхолинэстеразы накапливается ниже лигатуры. Такая же закономерность наблюдается и при инкубации сегмента нерва *in vitro*. Обратный аксоток ацетилхолинэстеразы показан при использовании метода наложения лигатуры на подъязычный и седалищный нервы животных, причем скорость ретроградного тока фермента в седалищном нерве 220 мм/сут (Vgray et al., 1971). Обратный аксоток характерен также для ацетилхолина в передних корешках спинного мозга кроликов, MAO в спинномозговых нервах амфибии, дофамин- $\beta$ -гидроксилазы в симпатических ганглиях крыс, норадреналина (очевидно, в составе СП) в седалищном нерве крыс и кошек, митохондрий в периферических нервах животных. Dahlström (1967) считает, что обратный аксоток норадреналина возможен в небольшом отрезке нерва.

На седалищном нерве кошки, пережатом в двух местах через 6 сут после введения в спинной мозг  $^3\text{H}$ -лейцина, Lasek (1967) показал наличие обратного тока меченых белков, уступающего по интенсивности прямому аксотоку. Аналогичные данные были получены в отношении обратного аксотока меченых белков в подъязычном нерве кроликов.

При инкубации мышцы улиток с  $^{14}\text{C}$ -глутаматом меченый материал появлялся через 8—24 ч в мозге; те же результаты получены на седалищном нерве лягушки. В среду с радиоактивным изотопом помещали конец мышцы, лишенный нервных окончаний, но метка через некоторое время появлялась в нервном волокне (Kerkut, 1968).

В последнее время получены убедительные доказательства существования обратного аксотока в аксонах сетчатки путем флюоресцентного экзогенного маркера — пероксидазы (Bunt et al., 1974).

Роль обратного аксотока может заключаться в удалении из терминалей продуктов обмена, в регуляции обмена и скорости транспорта веществ по аксону, в осуществлении обратных связей от пост- и пресинаптических структур к центру исполнительного нейрона, в регуляции процессов дегенерации и регенерации нервов. В регенерирующем нейроне повышенный синтез белков направлен на обновление структурных белков цитоплазматических волокон за счет локального снижения синтеза других белков. Большую роль в регуляции аксотока в условиях регенерации играет нервно-ростовой фактор (НРФ). Известно, что НРФ увеличивает скорость быстрого аксотока белков в симпатических нервах мышей (Almon, McCluge, 1974). После подкожного введения крысам НРФ в симпатических ганглиях увеличивается содержание тубулина (Stöckel et al., 1974). В присутствии ГТФ НРФ повышает скорость полимеризации тубулина с образованием интактных микротрубочек (Levi et al., 1975). На важную роль НРФ в регуляции прямых и обратных трофических влияний терминалей и постсинаптических структур указывают факты наличия обратного аксотока НРФ в симпатических нервах мышей (Iversen et al., 1975).

После перерезки нервов в телах соответствующих нейронов наблюдается хроматолиз (максимум спустя 1—2 нед после перерезки), проявляющийся в набухании клеток, разрушении полисом, снижении количества белка и РНК. Далее постепенно происходит прораствание нерва и созревание волокон до нормальной толщины. Скорость регенерации, как правило, составляет 2—5 мм/сут. Возникают вопросы: кто дал сигнал телу нейрона изменить режим работы белоксинтезирующей системы и кто дал сигнал хроматолизу? Сигналом могут служить изменения обратного аксотока при денервации. Показано (Kristensson, Ollson, 1974), что начало хроматолиза в дегенерирующих аксонах подъязычного нерва кроликов сопряжено с ускорением об-

ратного аксотока (тест с пероксидазой). Обычно хроматолиз более выражен, если нерв перерезан ближе к телу нейрона. По-видимому, в этом случае время поступления с обратным аксотоком НРФ в тело нейрона резко сокращается. В критических ситуациях (например, при регенерации) НРФ способен индуцировать синтез тирозингидроксилазы и дофамин- $\beta$ -гидроксилазы в симпатических ганглиях (Thoenen et al., 1971).

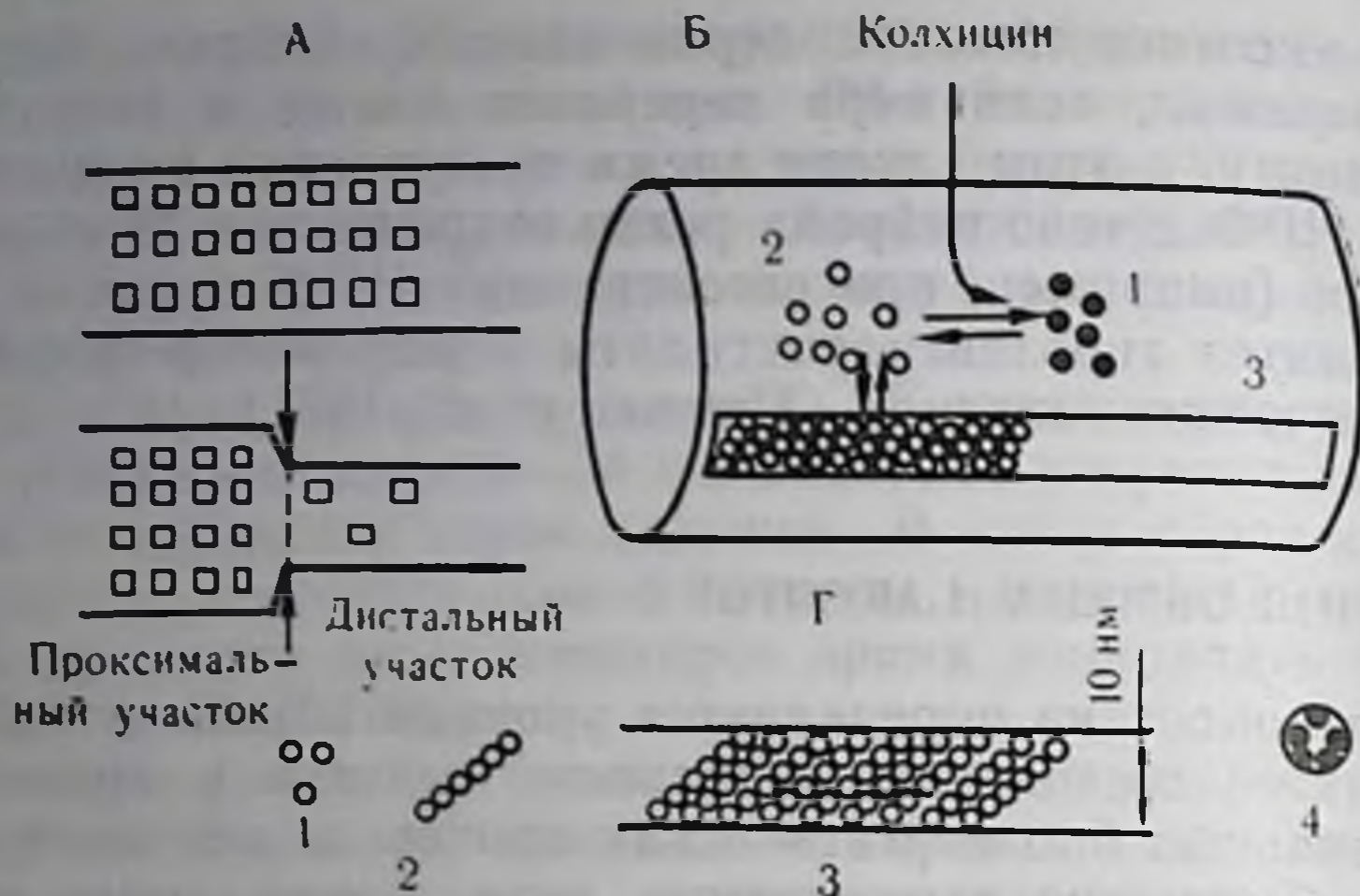
## ИЗМЕНЕНИЯ ОБМЕНА И АКСОТОК

Мощность аксотока определяется уровнем обмена в теле нейрона, а также состоянием локального синтеза макромолекул и интенсивностью биоэнергетических процессов непосредственно в аксонах. Снижение температуры тела, понижающее интенсивность обмена в нейронах, а также способствующее обратимой реакции деполимеризации микротрубочек до тубулина, приводит к уменьшению скорости быстрого аксотока белков в большей степени, чем медленного (Ochs, Smith, 1975). Снижение скорости быстрого аксотока белков в седалищном нерве и в задних корешках спинного мозга кошки наблюдается в условиях гипоксии, а также при аппликации на нервы ингибиторов гликолиза, цикла Кребса, дыхания, разобщителей окислительного фосфорилирования (Ochs, 1974). Последующее (после моноацетата) добавление в инкубационную среду лактата и пирувата способствует восстановлению скорости быстрого аксотока белков в спинальных корешках.

Ингибиторы энергетических процессов тормозят прямой аксоток в большей степени, чем обратный (Edström, Hanson, 1973). Указанные метаболические яды вызывают резкое уменьшение содержания АТФ в нервах и тем самым снижают степень сокращения микротрубочек (и нейрофиламентов), а значит, и интенсивность аксотока. Блокаторы SH-групп белков (в том числе и сократительных) тормозят скорость быстрого аксотока белков в седалищном нерве лягушки (Edström, Mattsson, 1972).

Таким образом, энергетическое обеспечение аксотока осуществляется совокупностью процессов окислительного фосфорилирования и гликолиза в аксоплазме. Учитывая, что внутриаксональные запасы АТФ могут быть недостаточны (0,2 ккал/сут) для оптимального обеспечения аксотока, часть энергии может поступать внутрь аксона извне, т. е. из леммоцитов в периферические нервы и из глиоцитов в центральные аксоны.

Ингибиторы рибосомного синтеза белка (ацетоксициклогексимид, циклогексимид или пурамицин), если их вводить в организм после инъекции меченого предшественника белка, как правило, не влияют на скорость аксотока белка, уже синтезированного в теле нейрона. Однако если эти ингибиторы вводить до

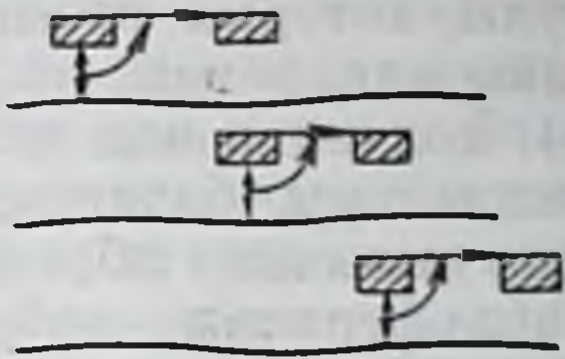


инъекции меченых аминокислот, отмечается торможение скорости быстрого аксотока белков в передних корешках спинного мозга кроликов и гликопротеидов в зрительном нерве золотой рыбки, а также медленного аксотока белков в подъязычном и блуждающем нервах, обновление белков и гликопротеидов в синапсосомах мозга разных животных, причем в основном тормозится обновление гликопротеидов и ганглиозидов в синаптических мембранах. При введении *in vitro* циклогексимида в узловой ганглий наблюдается снижение скорости быстрого аксотока белков и гликопротеидов в блуждающем нерве кроликов, при этом ингибитор, введенный в аксоны, не влияет на скорость быстрого аксотока (McLean et al., 1975).

## МЕХАНИЗМ АКСОТОКА

Нейрофиламенты и микротрубочки, характерные для аксонов (и дендритов) цитоплазматические волокна, впервые описал Schmitt (1957). Нейрофиламенты представляют собой трубчатые структуры диаметром до 7—10 нм (толщина стенки 3 нм), ориентированные вдоль оси аксона, они расположены параллельно друг другу, не прерываются в аксоне и проходят через перехваты узла (перехват Ранвье). От стенки филаментов в радиальных направлениях отходят короткие палочкообразные выступы. Каждый нейрофиламент (рис. 7) представляет собой спирально скрученную нить, состоящую из глобулярных белковых субъединиц филарина. Микротрубочки — структуры диаметром 20—26 нм, толщина стенки их составляет 5—6 нм. В центре трубочки может находиться тонкая филаментозная нить. Плотная стенка микротрубочек состоит из 10—13 спирально скручен-

В



24 нм

Рис. 7. Участие цитоплазматических волокон в механизме аксотока.

А — обнаружение аксотока при наложении лигатуры на нерв в проксимально-дистальном направлении (спустя несколько дней или недель). Б — действие колхицина на микротрубочки: 1 — тубулин, связанный колхицином; 2 — свободный тубулин; 3 — микротрубочка; В — миграция органелл, например СП (заштрихованные прямоугольники), вдоль полимерной цепи микротрубочки, содержащей связанные ГТФ или АТФ. В структуре СП имеется центр, связывающий АТФ, по-видимому, миозиноподобный белок. Образование актомиозинового комплекса (↑) дает новый векторный импульс СП вдоль поверхности микротрубочек (Schmitt, 1968); Г — структура цитоплазматических волокон: 1 — мономеры глобулярного белка нейрофиламентов; 2 — полимерная цепь; 3 — нейрофиламент, состоящий из спирально скрученных 5 полимерных цепей; 4 — нейрофиламент (вид с торца); 5 — микротрубочка, состоящая из спирально скрученных 13 полимерных цепей, по центру проходит одна полимерная цепь как возможная форма «крепления» структуры.

ных филаментозных нитей диаметром 3—4 нм. В состав микротрубочек входят глобулярные белковые субъединицы — тубулин (см. рис. 7). Микротрубочки, как и нейрофиламенты, располагаются параллельно и составляют пространственный каркас аксона.

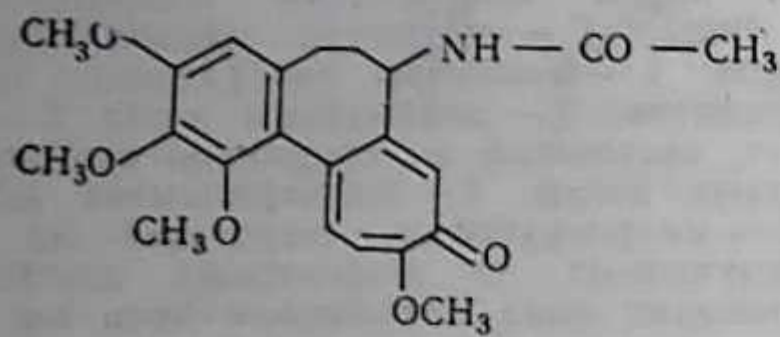
В ходе онтогенеза количество нейрофиламентов увеличивается, возможно, за счет распада микротрубочек. У взрослых животных число нейрофиламентов в крупных аксонах больше, чем микротрубочек. Больше всего нейрофиламентов в центре осевого цилиндра аксона, микротрубочек — в периферических участках аксона. Поскольку диаметр микротрубочек больше диаметра нейрофиламентов, входящих в состав стенки микротрубочки, то процесс перехода нейрофиламенты  $\rightleftharpoons$  микротрубочки должен сопровождаться структурной перестройкой субъединиц.

В цитоплазме нервных клеток нейрофиламенты могут объединяться в нейрофибриллы. Предполагается, что незернистая цитоплазматическая сеть является источником образования цитоплазматических волокон — «внутриаксональных мышц», по выражению Ochs (1974).

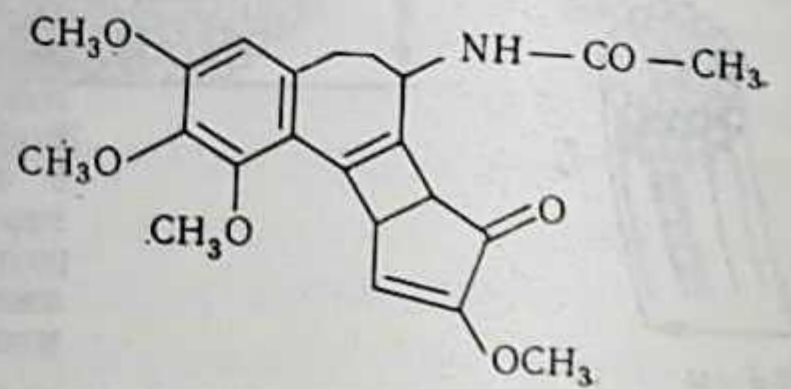
Микротрубочки и нейрофиламенты обладают сократительными свойствами. По предположению Schmitt (1968), с микротрубочками связан быстрый аксоток органелл, а с нейрофиламентами — медленный аксоток веществ. Транспортную функцию в нитях аксоплазмы выполняет система АТФ — АТФ-аза — сократительный белок, регулируемая двухвалентными ионами, особенно  $Ca^{++}$ . Считается, что медленный аксоток — это пассивный, а быстрый аксоток — активный транспорт органелл и веществ по аксону. Schmitt предположительно объяснил миграцию СП образованием комплекса с микротрубочками, подобного актомиозину мышц. Для доказательства сократительной функции



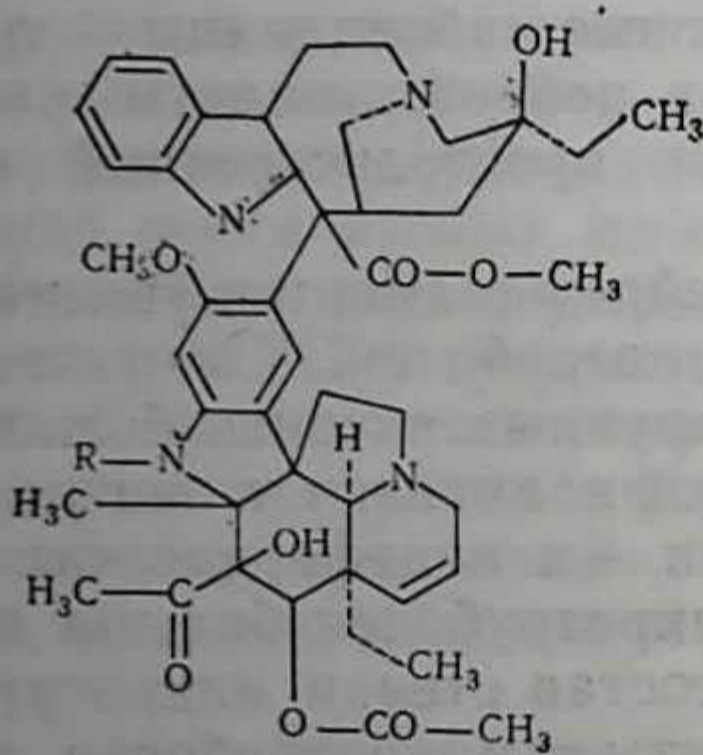
цитоплазматических волокон в аксоплазме и их участия в продвижении органелл и веществ по аксону исследователи используют обычно митотические яды, формулы которых приведены ниже (в скобках со знаком минус указаны алкалоиды, не обладающие антимитотической активностью), колхицин или винбластин, блокирующие митоз ядер, и цитохалазины, блокирующие митоз цитоплазмы. Первые два алкалоида вызывают обратимую дефрагментацию микротрубочек и пролиферацию нейрофиламентов; цитохалазины разрушают структуру только нейрофиламентов.



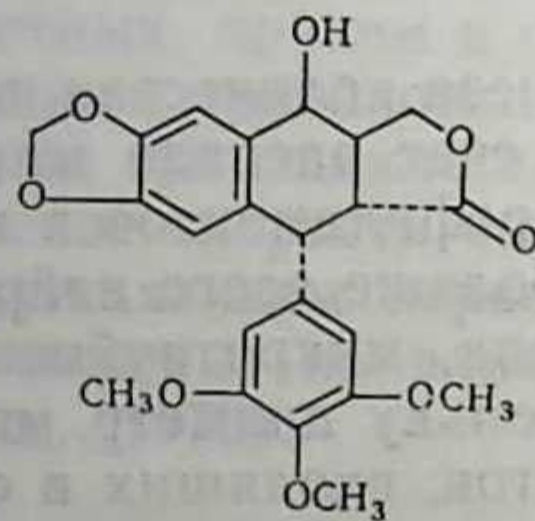
Колхицин.



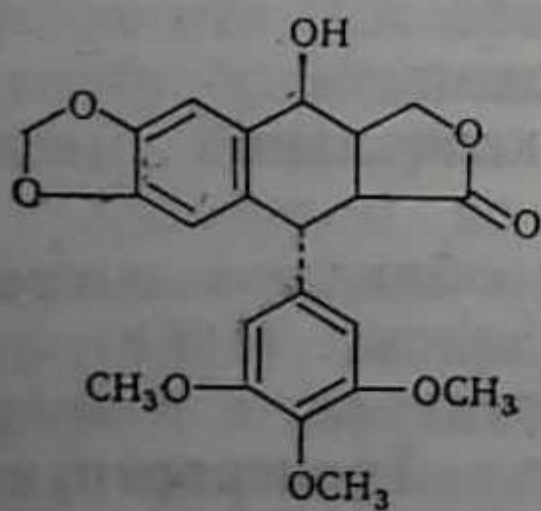
β(γ)-Люмикоколхицин (-)



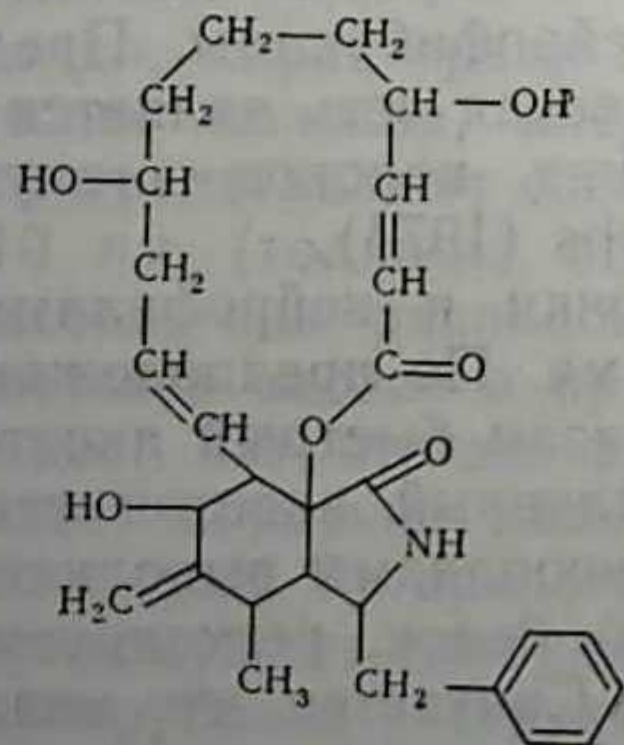
R=CH<sub>3</sub> Винбластин  
R=CHO Винкристин



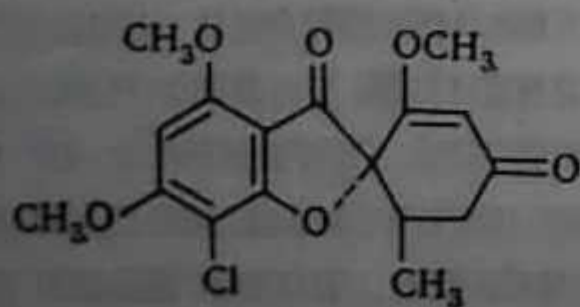
Подофиллотоксин



Пикроподофиллотоксин (-)

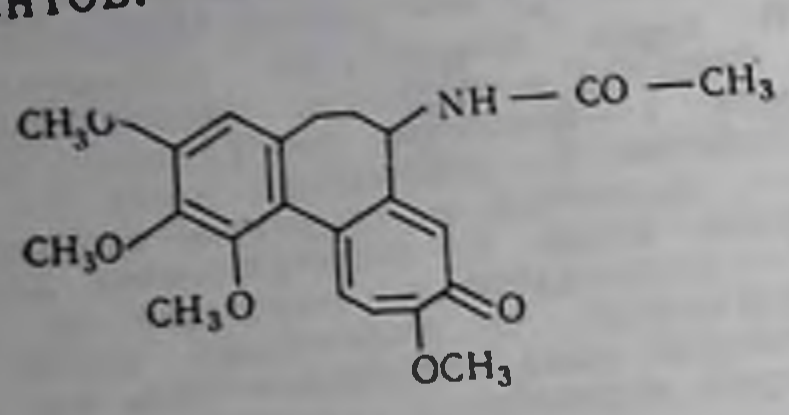


Цитохалазин В

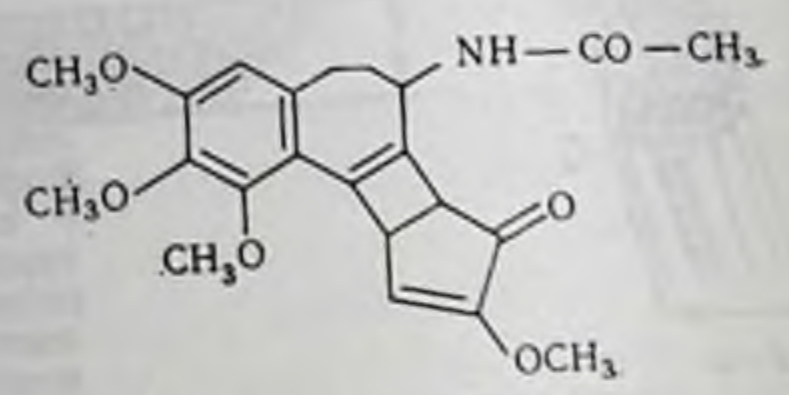


Гризеофульвин

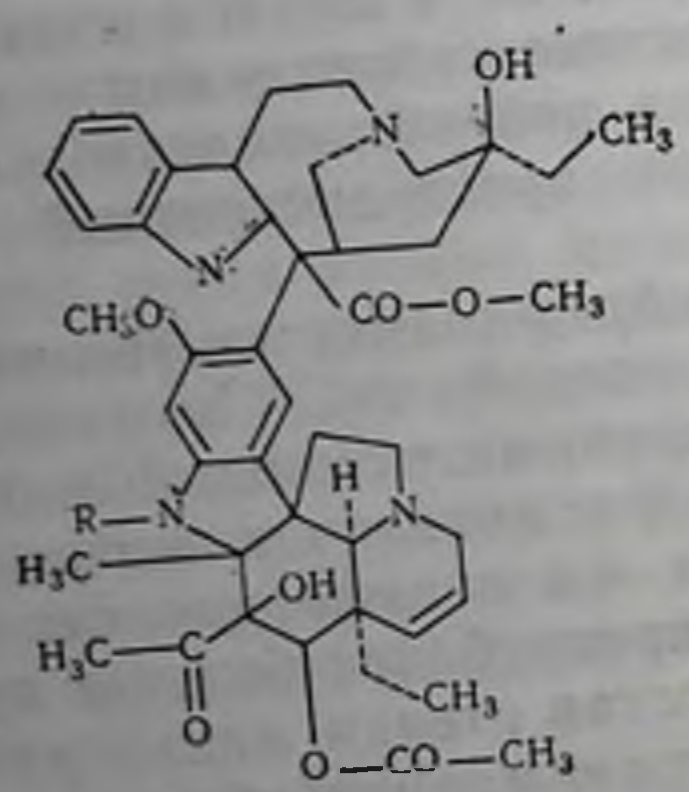
цитоплазматических волокон в аксоплазме и их участия в передвижении органелл и веществ по аксону исследователи используют обычно митотические яды, формулы которых приведены ниже (в скобках со знаком минус указаны алкалоиды, не обладающие антимитотической активностью), колхицин или винбластин, блокирующие митоз ядер, и цитохалазины, блокирующие митоз цитоплазмы. Первые два алкалоида вызывают обратимую дефрагментацию микротрубочек и пролиферацию нейрофиламентов; цитохалазины разрушают структуру только нейрофиламентов.



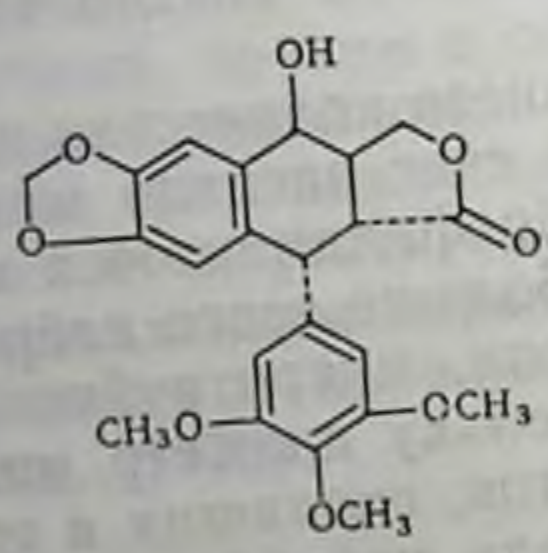
Колхицин.



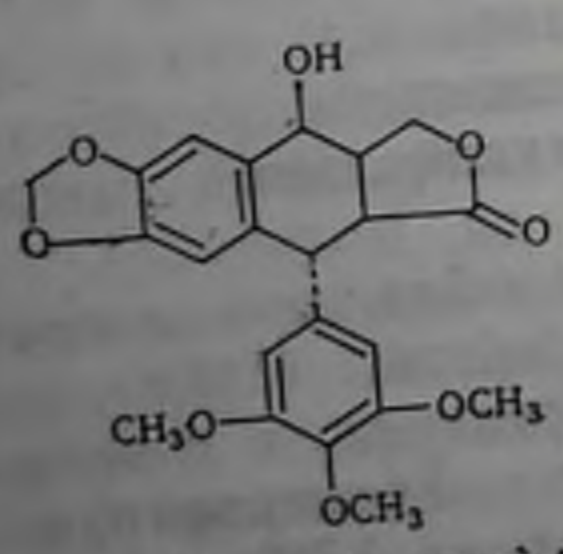
$\beta(7)$ -Люмиколхицин (-)



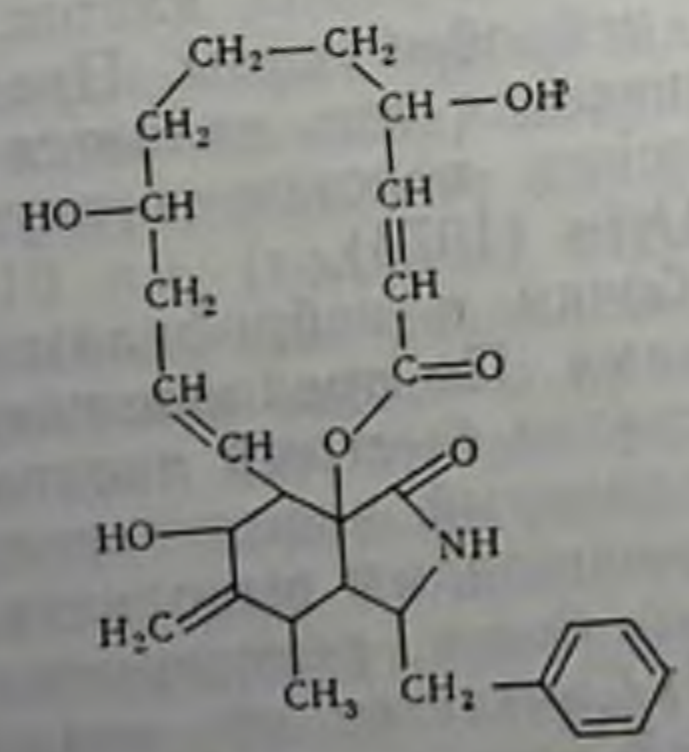
R=CH<sub>3</sub> Винбластин  
R=CHO Винкристин



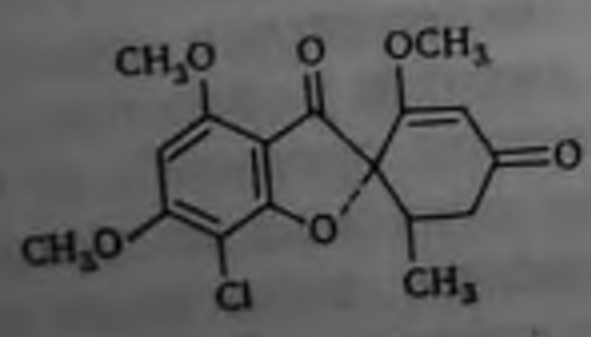
Подофиллотоксин



Пикроподофиллотоксин (-)



Цитохалазин В



Гризеофульвин

Анализ многочисленных работ указывает на следующие закономерности: 1) митотические алкалоиды блокируют в опытах *in vitro* и *in vivo* аксоток различных макромолекул и органелл в ЦНС и периферических нервах; 2) торможение быстрого аксотока проявляется в большей степени, чем медленного; 3) прямой аксоток нарушается алкалоидами гораздо больше, чем обратный; 4) действие митотических ядов и их аналогов на аксоток коррелирует со степенью деполимеризации микротрубочек до тубулина (наибольшим эффектом обладает подофиллотоксин, в несколько меньшей степени — колхицин и гризеофульвин); 5) митотические яды, блокируя аксоток, вызывают в конечном итоге симптом денервации эффекторных клеток, например, в нервно-мышечных синапсах (Thesleff, 1974). При действии митотических ядов *in vivo* важно учитывать их возможное влияние на систему синтеза белка. Данные по этому вопросу противоречивы. Одни авторы (Hemminki, 1973) считают, что колхицин и цитохалазины способны тормозить синтез мембранных белков мозга, а по данным других (Grothers, McCluer, 1975), колхицин не влияет на белоксинтезирующую систему нервных клеток. Связывающий колхицин белок (тубулин) в основном медленно мигрирует по аксонам, обнаруживается преимущественно во фракции синаптических мембран и в меньшей степени в СП (Feit, Barondes, 1970).

McGregor и соавт. (1973) предполагают, что быстрый аксоток веществ и структур осуществляется интактными микротрубочками, а медленный составляют белки самих микротрубочек за счет их постоянного удлинения. По мнению Ochs (1971), транспортирующие нити микротрубочек и нейрофиламентов сами мигрируют по аксону в область терминалей, т. е. как бы сползают в нервные окончания, где деструктируются, а элементы этих нитей, как мы уже отмечали, могут встраиваться в мембранные структуры.

Имеющиеся данные указывают на универсальность транспортной системы в аксоплазме. Однако остается загадкой способ «переключения» прямого и обратного аксотока. Возможно, что существуют независимые пути для их осуществления.

Относительная роль микротрубочек и нейрофиламентов в механизмах аксотока не ясна. Например, при дегенерации нейрофиламентов, вызванной кратковременным воздействием хлорида алюминия, прямой быстрый аксоток белков (400 мм/сут) в мотонейронах спинного мозга кролика не нарушается, однако при длительном воздействии наблюдается снижение скорости обратного аксотока экзогенного альбумина, меченного красителем (Liwnicz et al., 1974). С другой стороны, отмечается морфологическая сохранность части микротрубочек ганглиев речного рака на фоне прекращения аксотока белка (Fernandez et al., 1971). Аналогичное необычное действие колхицина *in vivo* наблюдали Dustin и соавт. (1975) при радиоавтографическом ис-

следовании быстрого аксотока в нейросекреторных гранулах в околожелудочковом и надзрительном ядрах нейронов подбугорной области крыс. Авторы объясняют торможение аксотока тем, что колхицин в соответствующих дозах действует на микротрубочки, изменяя их ориентацию в аксоплазме.

Торможение аксотока в нервных волокнах не вызывает значительных изменений в механизме секреции медиаторов, если локальное воздействие митотических ядов не затрагивает непосредственно терминали. Другими словами, истощение запасов СП, транспортируемых по аксону, торможение обмена и скорости аксотока ферментов, участвующих в синтезе медиаторов, не приводит сразу к ответной реакции — блокаде секреции медиаторов.

Попытки объяснить механизм аксотока только наличием гидростатических сил, создаваемых за счет изменений диаметра аксона на всем его протяжении, оказались непродуктивными, хотя этот фактор и нельзя исключить совсем, поскольку известно, что микротрубочки довольно чувствительны к изменению давления. Также несостоятельной оказалась попытка объяснить обратный аксоток капиллярными явлениями вдоль стенок аксона.

Heslop (1974) предполагает, что быстрый аксоток обуславливает транспорт различных внутриклеточных органелл и входящих в их состав макромолекул вдоль транспортирующих нитей, а медленный аксоток — миграцию растворимых веществ. Автор построил модель по аналогии с образованием молекулярных мостиков между актиновыми и миозиновыми нитями в мышцах. По его мнению, сначала транспортируемые органеллы (СП, митохондрии, лизосомы, фрагменты незернистой сети) образуют аналогичные мостики с микротрубочками. Сцепление этих органелл и последующее сокращение в присутствии  $Ca^{++}$  и АТФ обеспечивают их перемещение и разрыв связи с возможностью образования нового контакта — сцепления в другой точке. Эта модель быстрого аксотока позволяет объяснить такие его свойства, как потребность в энергии, неравномерность, т. е. дискретное перемещение структур, разнообразие скоростей в зависимости от типа и размеров органелл, чувствительность к колхицину, возможность транспорта в двух направлениях. Hoffman, Lasek (1975) показали, что с медленным аксотоком чувствительных и двигательных нервов спинного мозга крыс или кошек транспортируется миозиноподобный белок, очевидно, в составе нейрофиламентов. Различий в составе белков медленного аксотока обоих типов нервов разных животных не обнаружено. Показано, что 75% белков в составе медленного аксотока (соответствует 30% общего аксотока) приходится на долю 5 белков. Два из них (отн. мол. м.  $53 \cdot 10^3$  и  $57 \cdot 10^3$ ) соответствуют тубулину. Остальные три белка (отн. мол. м.  $212 \cdot 10^3$ ,  $16 \cdot 10^4$  и  $68 \cdot 10^3$ ) входят, по-видимому, в состав нейрофиламент-

тов. В составе медленного аксотока все эти белки транспортируются не в растворимой форме, а в составе волокон. Исходя из этого, авторы предполагают, что перистальтические движения аксоплазмы могут быть результатом взаимодействия актиноподобного белка, локализованного в примембранном слое аксолеммы, с миозином филаментов.

При хронической обработке седалищного нерва крыс анестетиками отмечается угнетение быстрого аксотока белков, ацетилхолинэстеразы и норадреналина (Bisby, 1975). Механизм действия анестетиков, возможно, не зависит от блокирования деполяризации аксональных мембран, так как в некоторых опытах использовали такие концентрации анестетиков, которые тормозили скорость быстрого аксотока, но не влияли на возбудимость седалищного нерва лягушки или блуждающего нерва кролика. Анестетики обратимо тормозят полимеризацию тубулина в микротрубочки, способствуют деполимеризации этих структур, снижая их количество в аксоплазме.

#### АКСОТОК И ДЕПОЛЯРИЗАЦИЯ МЕМБРАН

Данные о влиянии деполяризации аксональных мембран на скорость и объем аксотока противоречивы. Стимуляция электрическим током ганглиев моллюсков (тритонии) увеличивает скорость аксотока белков и РНК (Т. А. Аджимолаев и др., 1972). Аналогичный эффект установлен ранее в отношении ганглиев улитки (Kerkut, 1968). Стимуляция электрическим током в течение часа преганглионарного глазодвигательного ствола цыплят увеличивала скорость быстрого аксотока белков и транссинаптически активировала синтез белка в ресничном ганглии (Kiss et al., 1974). При стимуляции электрическим током (2 Гц, 1 ч) поясничного симпатического нерва спинного мозга крыс на 40% возрастает скорость аксотока норадреналина и дофамин- $\beta$ -гидроксилазы. При стимуляции электрическим током в течение 3 ч изолированных сегментов блуждающего нерва кроликов отмечается усиление быстрого аксотока белков (Badg, McLean, 1975). Авторы считают, что причиной активации может служить деполяризация мембран нейронов.

По другим данным, синаптическая стимуляция двигательных мотонейронов передних рогов спинного мозга кошек не изменяет скорость медленного и быстрого аксотока белков в нерве, хотя синтез белков в мотонейронах и нерве при этом увеличивается (Lux et al., 1970). Длительная стимуляция электрическим током (7 Гц, 6 ч) поясничной симпатической цепочки не вызывала существенных изменений скорости аксотока норадреналина в селезеночном нерве кошки, но увеличивала его количество (Dahlström, 1974). Вызванная  $K^+$  деполяризация седалищного нерва не оказывает значительного эффекта на ско-

рость быстрого аксотока белков (Ochs, 1974). При увеличении в солевой среде концентрации KCl до 100 мМ или при действии уабанна (0,1 мМ) отмечается умеренное угнетение скорости быстрого аксотока (Edström, 1975). Введение в глазное яблоко золотой рыбки уабанна приводит при морфологической сохранности микротрубочек к угнетению аксотока белков и нуклеозидов в зрительном тракте мозга (Wolburg, 1976). White и соавт. (1972) при инкубации срезов коры мозга крыс с  $^3\text{H}$ -лейцином в среде 55 мМ KCl обнаружили уменьшение интенсивности обмена белков синапсом, в то время как инкубация с уабанном повышала его. Авторы рассматривают эти факты как возможное доказательство изменения скорости быстрого аксотока белков при деполяризации мембран.

В аксоплазме при деполяризации накапливаются  $\text{Ca}^{++}$ , которые, с одной стороны, могут влиять на структуру микротрубочек и, следовательно, регулировать объем аксотока, с другой — активно поглощаться митохондриями. В последнем случае возрастает накопление в митохондриях субстратов цикла Кребса, особенно сукцината, а затем и количество синтезируемой АТФ, в результате чего создаются предпосылки для увеличения локального синтеза белков в аксонах. По крайней мере на эту возможность указывают данные об активации синтеза белка в аксонах кальмара после их стимуляции электрическим током, однако в этом случае синтез РНК не изменяется (Fischer et al., 1968). В опытах *in vitro* на спинальном ганглии лягушки показано, что добавление в инкубационную среду 1 мМ ЭГТА значительно (на 60%) уменьшает скорость быстрого аксотока белков. Если проводить инкубацию в бескальциевой среде, не добавляя ЭГТА, количество мигрирующего белка снижается на 25%. В этих условиях скорость поглощения  $^3\text{H}$ -лейцина ганглиями и синтез белка в них не изменяются. В опытах *in vitro* скорость быстрого аксотока белков тормозится на 40—60%, когда тела нейронов спинального ганглия лягушки или быка инкубируют в бескальциевом растворе, и не изменяется, если инкубируют только нервные волокна (Hammerschlag et al., 1975). В этих же исследованиях указывается на быструю миграцию  $^{45}\text{Ca}$ , очевидно, в составе органелл. Исследователи полагают, что  $\text{Ca}^{++}$  инициирует работу транспортной системы цитоплазматических волокон аксоплазмы.

Недавно проведено оригинальное исследование структуры микротрубочек в аксонах нейронов органа растяжения рака при деполяризации (В. К. Павленко, 1976). Поляризационно-оптический анализ показал, что при деполяризации (стимуляция электрическим током или KCl) или при повышенной  $[\text{Ca}^{++}]_0$  изменяется ориентация микротрубочек: исчезает их изломанность под определенным углом.

Регуляция аксотока при помощи  $\text{Ca}^{++}$  при деполяризации аксональных мембран может дополняться действием цикличе-

ских нуклеотидов. Известно, что тубулин способен полимеризоваться при фосфорилировании цАМФ-чувствительной протеникиназой и тем самым цАМФ вместе с  $\text{Ca}^{++}$  участвует в регуляции формирования микротрубочек. При деполяризации аксональных мембран можно ожидать увеличения активности АДЦ-азы и протеникиназы, а значит, и ускорения аксотока. Экспериментальные данные по этому вопросу в литературе отсутствуют. Предполагается (Kerikut, 1968), что при возбуждении синаптических процессов и осуществлении трансинаптической передачи ускоряется аксоток только функционально важных белков.

В синапсосомах морского конька, или гиппокампа, при обучении крыс добыче корма неpreferred (левой) лапой выявлено увеличение интенсивности обмена высокомолекулярных белков и снижение таковой низкомолекулярных белков (отн. мол. м. до  $11 \cdot 10^3$ ) фракции синаптических мембран; при этом в микросомах интенсивность обмена белков возрастает, а во фракции митохондрий мозга уменьшается (Levitap et al., 1972; Hyden et al., 1977). В этих опытах не обнаружено изменений в синтезе белков в субклеточных фракциях новой коры, но выявленные на ранних этапах обучения изменения в ткани морского конька исчезали при избыточном обучении. Предполагается (Bagondes, Squige, 1972), что формирование стабильной долговременной памяти связано с компонентами медленного аксотока. Возможно, что момент исчезновения амнезии вызывается доставкой к терминали порций белка, регулирующих эффективность синаптической передачи и формирование энграмм долговременной памяти.

Существует по крайней мере 4 фактора, лимитирующих скорость и объем аксотока: 1) состояние синтеза мигрирующего материала; 2) скорость новообразования микротрубочек и нейрофиламентов в теле нейрона и в аксоплазме; 3) влияние веществ (например, местных анестетиков, НРФ) непосредственно на систему сократительных нитей аксоплазмы; 4) состояние биоэнергетических процессов в теле нейрона и аксоплазме, т. е. фонда АТФ, и влияние веществ на мембранную проницаемость, или состояние фонда свободных  $\text{Ca}^{++}$ , инициирующих «работу» сократительного аппарата нитей аксоплазмы. Если учесть большую мощность аксотока, то возникает вопрос, куда исчезает вся масса веществ, поступающая в нервные окончания, и почему они «не лопаются» от такого «чрезмерного дара» нейронов. Поступающие в терминали белки могут расходоваться: 1) в процессах «функционального старения» (часть отростков утрачивается при старении организма, необходимо их восстановление); 2) на гидролиз части поступивших белков пептидгидролазами и вовлечение аминокислот в локальный синтез; 3) при трансформации сложных белков из простых; 4) в ходе трансинаптической передачи.

### 3. Биоэнергетические процессы в синаптических структурах

---

#### МИТОХОНДРИАЛЬНЫЕ И ЦИТОЗОЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ

Синаптосомы мозга животных содержат, хотя и относительно меньше, чем фракция митохондрий, набор митохондриальных ферментов: сукцинат- и малатдегидрогеназы, цитохромоксидазы, креатинкиназы, гексокиназы (Whittaker, 1966). Эти ферменты локализованы во фракции синаптических митохондрий. Очищенные СП не содержат митохондриальных ферментов. В синаптосомах выявляется активность этих ферментов: дегидрогеназы НАД·Н<sub>2</sub> и НАДФ·Н<sub>2</sub>, ацетил-КоА-синтетазы, фумарат-гидратазы, аминотрансферазы, D-аспартатоксидазы и активность типичных цитозольных ферментов: пиридоксалькиназы, ацетоацетил-КоА-тиолазы. Типичные цитозольные ферменты (лактатдегидрогеназа и пируваткиназа) обнаруживаются в цитоплазме синаптосом, хотя некоторая часть этих ферментов (по-видимому, один из изоферментов) определяется во фракции синаптических мембран. Активность лактатдегидрогеназы в легких синаптосомах выше, чем в тяжелых, а спектр изоферментов отличается от такового микросом и митохондрий мозга (Packman et al., 1971).

В синаптических мембранах и микросомах мозга выявляется высокая активность тиаминофосфат-пирофосфорилазы



Клетки нейронов подобны так называемой бессмертной амебе Гартмана: если у амебы постоянно ампутировать кусочки цитоплазмы, то она перестает делиться и практически не стареет. Нейрон же не делится и долго сохраняет «молодой» уровень обмена потому, что часть цитоплазмы непрерывно оттекает в аксон (и дендриты), обеспечивая постоянное обновление оставшейся части в результате синтеза новых молекул.

(Seijo et al., 1970). Пиридоксальфосфат локализуется преимущественно в пресинаптической части, причем обнаруживается как в цитозоле, так и в синаптических митохондриях (Loo, Mask, 1971). В цитоплазме синапсом содержится значительное количество немитохондриального НАД (Lindall, Frantz, 1967).

По данным Bradford и соавт. (1975), содержание АТФ в синапсосомах коры мозга крыс составляет 1—3 нмоль/мг белка. Содержание АТФ в синапсосомах коры мозга животных снижается при ишемии и резко увеличивается при замене сахаразы в инкубационной среде на 0,15 М КСl (Lee, Yatsu, 1974), снижается при действии NaF или ДНФ и увеличивается при снижении  $[Na^+]_0$  в растворе Кребса — Рингера (Swanson et al., 1974). Включение меченых аденина или аденозина в синапсосомы более интенсивно (в 2—3 раза), чем во фракции митохондрий мозга, при этом 70—80% радиоактивности обнаруживается в нуклеотидах; 17% — в аденозине, 3% — в инозине (Kugoda, McIlwain, 1974). Существует три фонда АТФ в нервных окончаниях: митохондрии, СП и цитозоль. Например, содержание АТФ во фракции СП коры мозга крыс составляет 10 нмоль/мг белка (Soller et al., 1973).

Ресинтез АТФ в синапсосомах коры мозга крыс при введении меченого неорганического фосфата в раствор Кребса — Рингера угнетают ДНФ, азид Na, пара-хлормеркурибензоат, грамицидин,  $Ca^{++}$ , олигомицин и увеличивают малат, пируват и  $Mg^{++}$ , в то время как монойодацетат не изменяет интенсивности обмена АТФ (Yamaguchi et al., 1968).

Во фракции синаптических мембран обнаружена высокая активность 5'-нуклеотидазы, расщепляющей АМФ до аденозина (Gombos et al., 1971). В цитоплазме синапсом присутствует аденозиндезаминаза, стимулируемая инозином, и АМФ-дезаминаза, стимулируемая одновалентными катионами ( $< 200$  мМ), аденозинфосфокиназа, гуанозинфосфорилаза (McIlwain, 1972).

Отношение АТФ/АДФ в синапсосомах больше, чем в гомогенате новой коры морской свинки, хотя содержание нуклеотидов в синапсосомах меньше, чем в гомогенате (Bagberis, McIlwain, 1976). Добавление 10 мМ глюкозы к раствору Кребса — Рингера при 37°C в 3 раза повышает поглощение кислорода свежесделанными синапсосомами (Bradford, 1969). Субстратами дыхания синапсом являются глюкоза и пируват, в их присутствии усиливается ресинтез АТФ и особенно фосфокреатина. Дыхание в митохондриях мозга в присутствии пирувата наблюдается лишь в фосфатной среде с низким содержанием  $Na^+$  и высоким —  $K^+$ . Дыхание и синтез АТФ ингибируются цианидом и монойодацетатом при воздействии на синапсосомы ультразвуком или в гипотонической среде, т. е. при разрушении нервных окончаний. Показано также, что глутамат является эффективным субстратом дыхания в митохондриях, но не в синапсосомах. Потребление  $O_2$  и дыхательный контроль в синапсосомах

мозга животных убывают в ряду субстратов: аскорбат > сукцинат >  $\alpha$ -кетоглутарат > пируват > глутамат (М. Д. Курский, Н. С. Бакшеев, 1974; Wernicke et al., 1975). Однако ряд становится обратным при потреблении  $O_2$  синапсосомами в присутствии АДФ. Verity (1972) привел доказательства того, что окислительное фосфорилирование в синапсосомах мозга крыс зависит от состояния ТМП мембран. В частности, показано, что дыхание синапсосом в состоянии дефицита АДФ (состояние 4, по Чансу) повышается при увеличении  $[Na^+]_0$  с 10 до 100 мМ. Этот эффект снимается убаанном, олигомицином, атрактилатом и довольно слабо проявляется в митохондриях.

Скорость гликолиза (по активности гексокиназы) в нервных окончаниях выше, чем во фракции митохондрий. С другой стороны, уровень окислительного фосфорилирования выше в митохондриях, чем в синапсосомах.

Синапсосомы, как и срезы мозга, обладают активной системой избирательного захвата гексоз против их градиента концентрации, а пассивная диффузия играет незначительную роль. Активная система захвата осуществляется при низких концентрациях гексоз, ингибируется убаанном, ДНФ и не зависит от изменений  $[Na^+]_0$ . Поглощенные внутрь синапсосом гексозы подвергаются фосфорилированию (Diamond, Fishman, 1973).

На высокую интенсивность гликолитических процессов в терминалях указывают данные о гексомонофосфатном пути окисления в синапсосомах. Показано, что в синапсосомах коры мозга крыс обмен углеводов до  $CO_2$  происходит только для  $^{14}C$ -1-глюкозы, но не для  $^{14}C$ -6-глюкозы (Appel, Ragot, 1970). Роль данного цикла заключается в генерации НАДФ· $H_2$ . Образование  $CO_2$  из пирувата в синапсосомах полосатого тела крыс почти полностью блокируется цианидами и активируется (в 3 раза) ДНФ (Lefresne et al., 1975). Увеличение  $[Na^+]_0$  в растворе Кребса — Рингера с 10 до 40 мМ приводит к возрастанию активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы в синапсосомах, но не в митохондриях (Kimura et al., 1974). Окисление  $^{14}C$ -1-глюкозы до  $CO_2$  в синапсосомах мозга крыс зависит от наличия  $Na^+$  в инкубационной среде, угнетается монойодацетатом и активируется ДНФ. У крыс зависимое от  $Na^+$  окисление глюкозы в синапсосомах становится максимальным спустя 70—90 дней после рождения.

Митохондрии мозга обладают исключительной структурной и функциональной гетерогенностью. Например, при фракционировании неочищенной фракции митохондрии мозга в линейном градиенте плотности сахарозы (1,0—1,7 М) удается идентифицировать до 60 отдельных фракций (Blokhuys, Veldestra, 1970). В более плотных митохондриях сомы нейронов активность глутаматдегидрогеназы максимальна, в средних по плотности (преимущественно митохондрии терминалей) активность ее мала, и митохондрии с низкой плотностью совсем не содержат

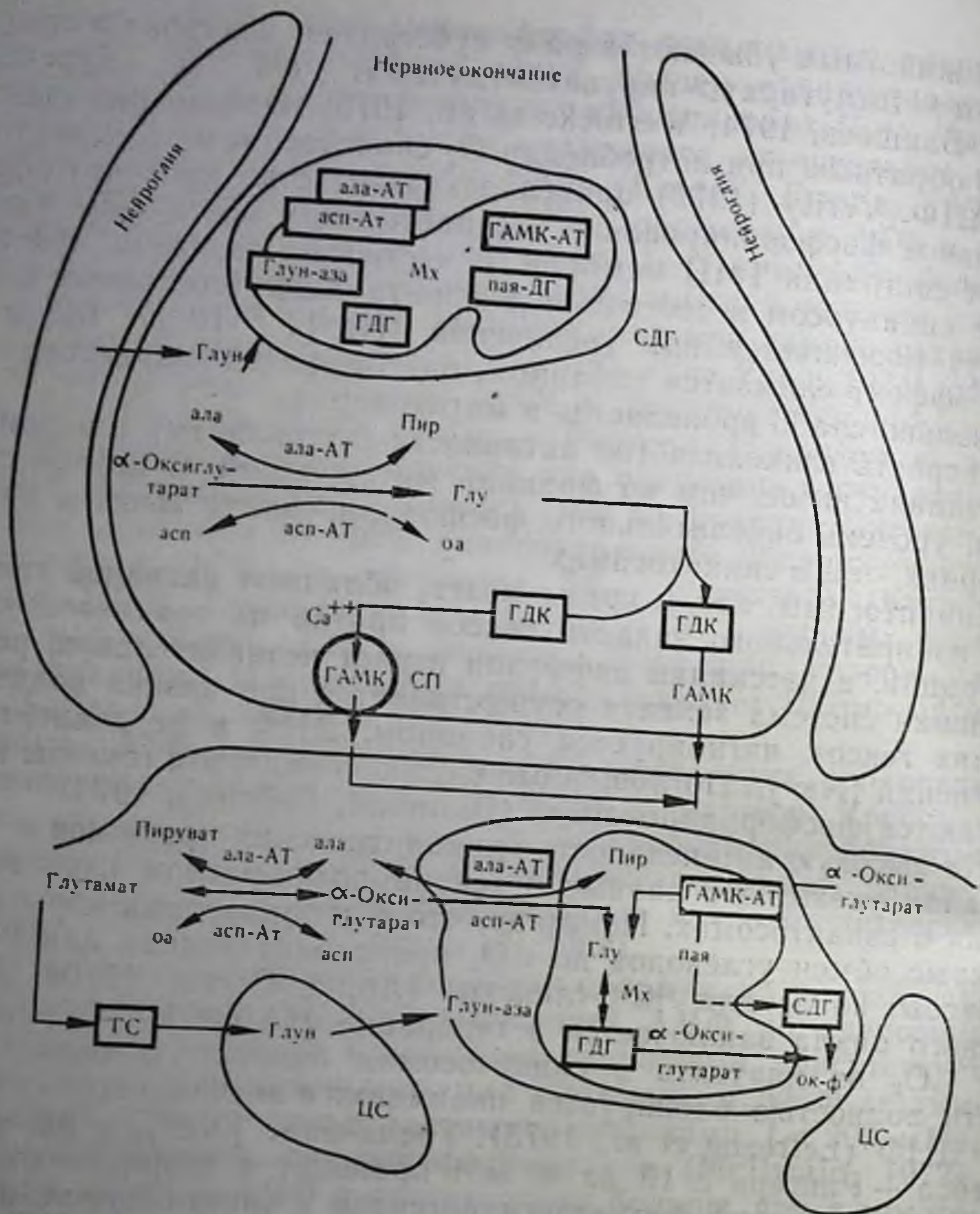


Рис. 8. Схематическое изображение обмена ГАМК и других аминокислот (по de Robertis, 1967).

Мх — митохондрии; ЦС — цитоплазматическая сеть; пая — полуальдегид янтарной кислоты; ГС — глутаминсинтетаза; ГДК — глутаматдекарбоксилаза; ГДГ — глутаматдегидрогеназа; ала-АТ — аланин-аминотрансфераза; оа — оксалоацетат; ала — аланин; пир — пируват; глю — глутаминовая кислота; глюн — глутамин; глюн-аза — глутаминаза; асп — аспартат; СДГ — сукцинатдегидрогеназа; пая-ДГ — дегидрогеназа пая; ок-ф — окислительное фосфорилирование.

этого фермента и обладают высокой активностью гексокиназы (Wilson, Bagch, 1971). Известно, что субстраты цикла Кребса могут контролировать обмен белков, липидов, углеводов и особенно аминокислот и медиаторов, синтезирующихся из аминокислот. Можно допустить некоторое различие функций синаптических и внесинаптических митохондрий. Окислительные ферменты в синаптосомах активируются при солибилизации 0,5%

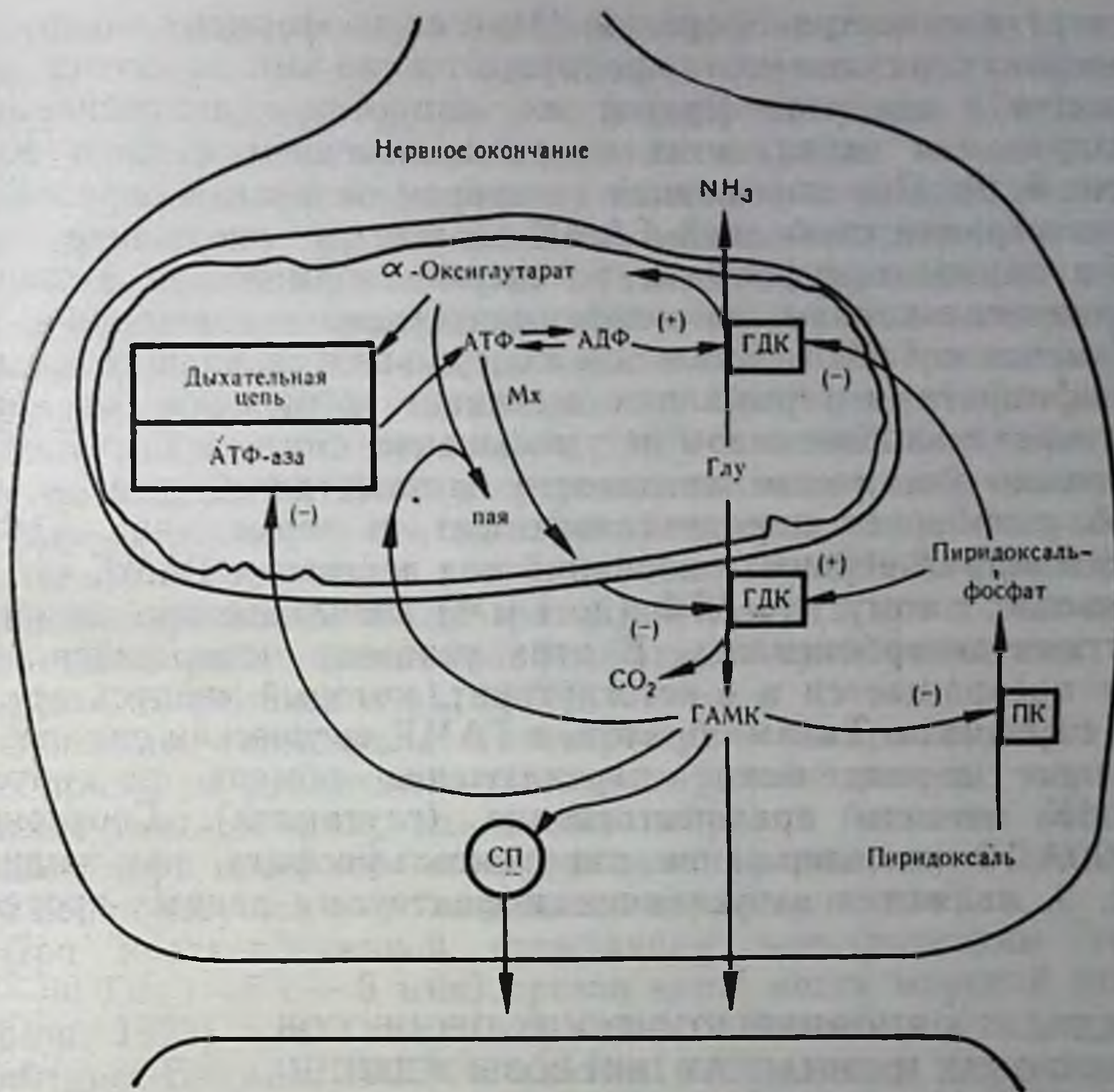


Рис. 9. Схематическое изображение обмена ГАМК (по Т. Г. Щипакниной, 1976).

ПК — пиридоксалькиназа; (+) — активация; (—) — торможение активности. Остальные обозначения те же, что к рис. 8.

раствором дезоксихолата сильнее, чем во фракции митохондрий мозга (Mooge, Lindall, 1970). По гистохимическим данным (Hajos, Kerpel-Fronius, 1971), синаптические митохондрии не окисляли  $\alpha$ -кетоглутарат и сукцинат, но окисляли пируват и малат, в то время как нейрональные митохондрии активно окисляли все перечисленные субстраты.

Нервные окончания с различной медиаторной специфичностью проявляют свои особенности при биоэнергетическом обмене. Например, в холинергических терминалях повышена активность митохондриальной ацетил-КоА-синтетазы для синтеза ацетилхолина, в митохондриях адренергических терминалей локализована MAO, в глутаматергических терминалях должна отсутствовать глутаматдекарбоксилаза и т. д. По мнению de Robertis (1967), поддержание равновесия между ГАМК и глутаматом в ГАМК-ергическом нервном окончании регулируется

аспартат-аминотрансферазой. Один ее изофермент может катализировать в ткани мозга преимущественно аминирование оксалацетата в аспартат, другой же, напротив, — дезаминирование аспартата в оксалацетат с его включением в цикл Кребса (рис. 8, 9). При достижении в нервном окончании определенной концентрации свободной ГАМК снижается содержание свободного пиридоксальфосфата вследствие торможения активности пиридоксалькиназы или неферментативного связывания этого фермента с ГАМК. Снижение содержания свободного пиридоксальфосфата в терминалях вызывает торможение активности глутаматдекарбоксилазы и уменьшение синтеза ГАМК. Одновременно увеличение активности глутаматдегидрогеназы, которую ингибирует пиридоксальфосфат, и торможение АТФ-азы митохондрий нервных окончаний под действием ГАМК (10 мМ) приводят к тому, что АТФ (до 1 мМ) дополнительно ингибирует глутаматдекарбоксилазу. В этих условиях остающийся глутамат превращается в  $\alpha$ -кетоглутарат, который «запускает» синтез глутамата. Таким образом, в ГАМК-ергическом синапсе происходит периодическое переключение обмена на синтез то ГАМК, то его предшественника (глутамата). Соотношение АТФ/АДФ и содержание пиридоксальфосфата, как видно из рис. 9, являются запускающими факторами данных процессов.

#### ИЗМЕНЕНИЕ БИОЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ В НЕЙРОНАХ И СИНАПСАХ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ

Как было показано выше, изменения потребления кислорода и продукции  $\text{CO}_2$  из  $^{14}\text{C}$ -1-глюкозы в синапсосомах зависят от мембранной проницаемости, т. е. происходят изменения обмена при смене состояний покой — возбуждение, направленных на последующую реполяризацию мембран и восстановление равновесия катионов. Изменения биоэнергетических процессов наблюдаются также в срезах мозга при их инкубации в модифицированном растворе Кребса — Рингера. Так, при снижении концентрации  $[\text{Na}^+]_o$  или  $[\text{K}^+]_o$  в срезах ткани мозга уменьшается содержание АТФ (Margolis, Lajtha, 1968).

В многочисленных исследованиях показано (McIlwain, 1962, 1974), что стимуляция электрическим током (20—100 Гц, 1—10 мин) или калиевая деполяризация (30—50 мМ KCl) срезов мозга животных в аэробных условиях в растворе Кребса — Рингера приводит к увеличению потребления кислорода, интенсивности субстратного дыхания и особенно гликолиза (содержание лактата); к значительному и монотонному снижению содержания в ткани креатинфосфата (на 70—80%) и быстрому снижению уровня АТФ (на 30%). Резкое снижение уровня АТФ в ткани в первые миллисекунды в ходе стимуляции электрическим током нормализуется в результате его ресинтеза.

В этих условиях отмечено увеличение содержания в ткани неорганического фосфата, источником которого могут быть не только АТФ и креатинфосфат, но и фосфопротеиды. Описанные эффекты обратимы, не наблюдаются в срезах невозбудимых тканей, усиливаются вератрином, ослабляются депрессантами и отмечаются также при раздражении мозга электрическим током *in vivo*. Кроме того, некоторые описанные эффекты (в частности, гликолиз) при стимуляции током срезов мозга снимаются тетродотоксином и более выражены в среде, содержащей  $Ca^{++}$  (Pull, McIlwain, 1973). Зависимое от  $Ca^{++}$  увеличение интенсивности дыхания (Kozawa et al., 1967) и снижение содержания АТФ (Huang, Daly, 1974) в срезах ткани мозга наблюдаются и при использовании таких деполяризующих агентов, как убаин, вератрин, батрахотоксин и при действии 2,4-ДНФ. При стимуляции электрическим током срезов коры мозга крыс отмечается возрастание роли гексозомонофосфатного пути окисления глюкозы до  $CO_2$  (Kimura et al., 1974).

Описанные изменения биоэнергетики воспроизводятся при деполяризации различных отделов нервной системы: верхнего шейного ганглия крыс, одиночных нейронов бокового вестибулярного ядра кроликов, электрического органа ската, седалищного нерва лягушек и блуждающего нерва кроликов.

При кратковременной стимуляции электрическим током (20—60 Гц, 1—5 с — 5 мин) срезов коры мозга морской свинки (Lipton, 1973) или задних корешков спинного мозга лягушек (Rodriguez-Estrada, 1975) в тканях наблюдается первоначальное увеличение интенсивности флюоресценции НАД·Н (фаза окисления, протекающая в митохондриях) с последующим ее снижением (фаза восстановления  $НАД^+$ , характерная для гликолиза и гликогенолиза).

Данные процессы, зависящие от  $Ca^{++}$ , обратимы и указывают на сопряженность процессов дыхания и гликолиза в нервной ткани при возбуждении.

Результаты опытов на срезах мозга или изолированных нервах не исключают того, что некоторые эффекты при деполяризации могут быть в какой-то мере обусловлены и деполяризацией глиальных клеток. В частности, увеличение интенсивности дыхания (Haljame, Hamberger, 1971), снижение содержания АТФ (Schousboe et al., 1970) и активности лактатдегидрогеназы (Minchin, Iversen, 1974) наблюдаются при калиевой деполяризации клеток нейроглии. Особенно наглядно это проявляется, если в качестве деполяризующего воздействия используют стимуляцию электрическим током, когда возбуждение нервных окончаний *in vivo* также приводит к адекватным изменениям митохондриальных и гликолитических процессов (снижение содержания АТФ, увеличение потребления кислорода, образование лактата). Интересно, что убаиновая деполяризация синапсом тоже способна вызывать изменение дыхания синаптических ми-

## Изменение биоэнергетических процессов в синапсах при действии деполаризующих агентов и медиаторов

Синапсомы	Агент	Показатель	Эффект	Авторы, год
Коры мозга крыс	Глутамат	Содержание АТФ	—	Bradford, 1969
Мозга крыс	Уабаин	Увеличение интенсивности дыхания (в состоянии 4, по Чапсу) при возрастании $[Na^+]_o$	—	Verity, 1972
Коры мозга морской свинки, крыс	KCl (15 мМ), глутамат, глицин (2 мМ), ГАМК (5 мМ), ацетилхолин (0,25 мМ), норадреналин или серотонин (0,02 мМ)	Поглощение $O_2$	±	Balfour, Gilbert, 1971; Spector, 1972
Коры мозга крыс	Норадреналин, серотонин или ацетилхолин (0,1 мМ)	Интенсивность гликолиза, окисление углеводов	+	Appel, Ragot, 1970
То же	Уабаин	На-зависимое окисление глюкозы до $CO_2$	—	Diamond, Fishman, 1973
	KCl (72 мМ)	То же	±	



Мозга крыс	Ацетилхолин (0,1 мМ), уабаин	Включение $^{35}\text{S}$ -тиамина в синтетические мембраны (зависит от $\text{Ca}^{++}$ )	+	Itohawa, Cooper, 1970
Коры мозга морской свинки, крыс	Стимуляция электрическим током (10 мин), ацетилхолин (0,1—1,0 мМ) + эзерин	Потребление $\text{O}_2$	+*	Widlund, Heilbronn, 1974; Bleasdale, Hawthorne, 1975
		Обновление АТФ при включении $^{32}\text{P}$	±	
		Активность лактатдегидрогеназы	—	
Коры мозга крыс	KCl (40 мМ)	Содержание АТФ, продуцируемое $\text{CO}_2$ из $^{14}\text{C}$ -1-глюкозы	±	Wernicke et al., 1975
Новой коры мозга морской свинки, коры головного мозга, опилного мозга крыс	Стимуляция электрическим током (100 Гц, 8 мин), KCl (33 мМ), стимуляция током (100 Гц, 8—30 мин), KCl (33—50 мМ)	Содержание АТФ	—	Bradford, 1975; Barberis, McIlwain, 1976
		Содержание АДФ	+	
		Образование лактата	+	
		Потребление $\text{O}_2$	+	

Обозначения: + активация; — торможение; ± отсутствие изменений; +\* эффект обратим.

тохондрий и тексозомонофосфатного пути окисления в цитозоле терминалей (табл. 3).

Таким образом, результаты, полученные McIlwain на срезах мозга, воспроизведены и уточнены на синаптосомах мозга. При деполяризации и секреции медиаторов наиболее существенно должно изменяться содержание АТФ в терминалях. С нашей точки зрения (см. главу 7), процесс можно разделить на три последовательных этапа: 1) деполяризация мембран, сопровождающаяся инактивацией Na,K-АТФ-азы и локальным увеличением содержания АТФ; 2) секреция медиаторов, при которой наблюдаются активация АТФ-азы сократительных белков и повышенный расход АТФ; 3) трата АТФ может компенсаторно «включать» систему ресинтеза АТФ, необходимого для реполяризации мембран, удаления  $Ca^{++}$  из терминалей, восстановительных процессов в синапсах.

При инкубации срезов мозга с ГАМК, норадреналином, гистамином и глутаминовой кислотой выявляются снижение в ткани содержания АТФ и увеличение образования лактата (для первых двух медиаторов последний эффект не проявляется) (Pull, McIlwain, 1975); ацетилхолин не изменяет содержания АТФ в ткани срезов (Nakazawa, Quastel, 1968). Изменения биоэнергетических процессов регистрируются и при инкубации синапсом с медиаторами (см. табл. 3). Существуют реципрокные отношения между ацетилхолином и норадреналином при их влиянии на гликолиз и активность фосфоорилазы в нервной ткани: норадреналин активирует, а ацетилхолин (через М-холинорецепторы) тормозит эти процессы, что объясняется конкурентными отношениями этих медиаторов при активации системы циклических нуклеотидов. Предполагают, что при возбуждающем действии норадреналина стимулируется анаэробная фаза гликолиза (окисление глюкозы до пирувата), а при тормозящем действии норадреналина активируется прямое окисление глюкозы (пентозный цикл) (см. Лабори, 1974).

#### 4. Обмен белков в синаптических структурах

---

##### ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБМЕНА БЕЛКОВ

Высокая интенсивность обмена белков мозга, их разнообразие, изменение скорости синтеза и состава различных, в том числе и нейроспецифических, белков мозга при функциональных и патологических состояниях ЦНС в последнее время стали предметом интенсивных исследований. Для обеспечения высокой пластичности нервных окончаний при возбуждении и торможении ЦНС, а также для трофической регуляции эффекторных клеток необходим интенсивный синтез различных белков. Особое внимание привлекают нейроспецифические белки и белки, с которыми связана работа секреторного аппарата (сократительные, Са-связывающие белки и кислые белки СП).

В среднем время полужизни ( $t_{50}$ ) суммарных белков нервных окончаний составляет 15—25 сут. Наиболее высокой интенсивностью обмена обладают белки, поступающие в терминали с быстрым аксотоком. В нервных окончаниях обнаружены белки с очень высокой интенсивностью обмена ( $t_{50}$  менее 1 сут). Снижение синтеза белков синаптических структур определяется состоянием локального синтеза; секрецией полипептидов в синаптическую щель вместе с медиаторами и их возможным поступлением в постси-

наптические структуры (осуществление трофической функции); скоростью обратного аксотока; дегенерацией нервных окончаний при функциональном старении. Увеличение синтеза белков зависит от скорости прямого аксотока; состояния локального синтеза и трансформации простых белков в синаптоплазме; деполяризации нервных окончаний; эндоцитоза, т. е. транспорта макромолекул из межклеточной среды; поступления веществ из нейроглии и постсинаптических структур. Многие из этих механизмов являются предположительными (Droz, 1973), и дальнейшая разработка этой проблемы представляется нам перспективной.

## ПРОСТЫЕ И СЛОЖНЫЕ БЕЛКИ

Учитывая морфологическую сложность синаптосом, обнаружение в этой фракции до 30—40 ферментов, белковый спектр, определяемый методом электрофореза в полиакриламидном геле, должен быть в высшей степени гетерогенным. Электрофоретические исследования необходимо проводить в двух направлениях: выявление возможной специфичности белков синаптосом и их субфракции по сравнению с другими субклеточными фракциями ткани мозга и выявление общих (универсальных) черт состава и строения мембран различных нейрональных структур.

Анализируя состав структурных белков различных фракций мозга при катодном электрофорезе в полиакриламидном геле в системе 3—8 М мочевины — фенолуксусная кислота — вода (2:1:1), Cotman, Mahler (1967) обнаружили во фракции синаптических мембран мозга крыс 15, в СП — 16, в синаптических митохондриях — 17, в миелиновых фрагментах — 3—4, в митохондриях — 5—6 белковых зон. Авторы выявили сходство и различие спектра структурных белков фракции синаптических мембран с фракцией СП, митохондрий и микросом мозга. В последующей работе (Cotman et al., 1968) установлено сходство спектра структурных белков фракции СП с микросомными везикулами и мембранами. Эти факты указывают на то, что СП могут формироваться в теле нейрона. Спектр структурных белков синаптических мембран мозга крыс имел много сходных черт с составом исследуемых белков мембран эритроцитов, но отличался от такового белков митохондрий и миелинов. Из последующих многочисленных работ (Р. Н. Глебов, Г. Г. Крыжановский, 1977), посвященных электрофорезу белков синаптосом мозга животных и их субфракций, следует, что белковый состав синаптосом, как и следовало ожидать, гораздо сложнее, чем состав белков митохондрий мозга. Помимо двух специфических водорастворимых (катодных и анодных) белков, в синаптосомах отмечается большое сходство состава (до 13—19 типов белков) цитозоля синаптосом с цитозольной фракцией клеток мозга. Набор полипептидов фракции синаптических мембран не-

сколько сложнее по своему спектру, чем микросом нейронов или нейроглии. Наряду с различием белкового состава микросом мозга и фракции синаптических мембран обнаружено по крайней мере три основных типа белков с отн. мол. м.  $45-58 \cdot 10^3$  (1% додецилсульфат, электрофорез в полиакриламидном геле) в синаптических мембранах, мембранах аксонов, клеточных мембранах дендритов и перикариона клеток мозга (Hemminki, 1973). Состав структурных гидрофобных белков синапсом и митохондрией (имеются в виду додецилсульфатные экстракты) в отличие от миелина не имеет видовых различий у позвоночных. Для фракции синаптических мембран мозга характерна высокая гетерогенность состава структурных белков (до 33) с отн. мол. м.  $25-200 \cdot 10^3$ . Электрофоретический «паспорт» белков фракции синаптических мембран мозга отличен от такового фракции синаптического комплекса, т. е. активной зоны синапсов (Morgan et al., 1973). Тритоновые экстракты белков фракции синаптических митохондрий (до 22 белков, анодный электрофорез) по своему составу практически не отличаются от аналогичного экстракта несинаптических митохондрий нейронов или нейроглии (McBride, Van Tassel, 1972). Содержание кислых белков (как водорастворимых, так и мембранно-связанных) в синаптических структурах значительно больше, чем основных (Р. Н. Глебов и др., 1970, 1972). Несмотря на общность белкового состава фракции СП и синаптических мембран, они имеют некоторые качественные и количественные отличия. В большей степени эти отличия касаются обмена белков (de Robertis, 1973) и гликопротеидов (Magko, Guenod, 1973) СП и синаптических мембран, липидного «паспорта» и различных сократительных белков и кислых полипептидов (см. главы 5, 7, 8), отсутствия во фракции СП ферментов, характерных для нейрональных мембран (Na,K-АТФ-аза, ацетилхолинэстераза и др.).

После анодного электрофореза 0,1% тритоновый экстракт фракции СП мозга животных разделяется на 22 типа белков, из которых четырнадцать присутствуют во фракции синаптических мембран (McBride, Van Tassel, 1972). При работе с высокоочищенными фракциями и додецилсульфатными экстрактами в присутствии 2 М мочевины в синаптических мембранах обнаружено 25 полос, содержащих 12 основных типов белков, и во фракции СП — 16 полос, содержащих 7 основных типов белков. Предполагается, что две из наиболее выраженных белковых фракций, на долю которых приходится 10% белков фракции синаптических мембран, соответствуют 2 субъединицам Na,K-АТФ-азы (Morgan et al., 1973). Недавно получены интересные данные о структурных белках фракции постсинаптической электронно-плотной области мозга крыс при исследовании додецилсульфатных экстрактов (Bankeg et al., 1974). Выявлено 8 типов белков, первый с отн. мол. м.  $97 \cdot 10^3$  (17% от всех белков данной фракции), второй белок с отн. мол. м.  $53 \cdot 10^3$ , составляющий

45% всех белков; остальные 6 высокомолекулярных белков составляют 3—9%. Белок с отн. мол. м.  $53 \cdot 10^3$  обнаружен также во фракциях синаптических мембран и СП.

При инкубации (10 мин,  $37^\circ\text{C}$ ) фракции СП коры мозга крыс в изотоническом растворе сахарозы частично высвобождаются ацетилхолин и до 12% белков СП, которые при электрофорезе в полиакриламидном геле дают одну зону. Последующая обработка СП в гипоосмотической среде с замораживанием — оттаиванием приводит к солюбилизации еще 2 типов кислых белков (до 9%), хотя, помимо этого, на электрофореграмме можно обнаружить 8 минорных белков (Matsuda et al., 1971). Во фракции СП электрического органа ската находится до 40% растворимых низкомолекулярных белков, в том числе везикулин; 60% составляют мембранно-связанные белки, додецилсульфатный экстракт которых при электрофорезе в полиакриламидном геле разделяется на 3 основных высокомолекулярных белка (Whittaker et al., 1974).

Электрофоретический анализ белкового спектра синаптосом и их структур давал недостаточную информацию о природе и функциях тех или иных белков синаптических структур. В некоторых работах делались попытки идентифицировать сложные белки. При изучении свойств СП мозга крыс оказалось (Solter et al., 1973), что 0,1% тритоновый экстракт содержит до 20 белков, среди которых обнаруживаются растворимые кислые липопротеиды, содержащие связанные нуклеотиды, а также большое количество глицина, аланина и серина. Изоэлектрическая точка этих белков равна 4,2.

Большая часть гликопротеидов локализована в синаптических мембранах (5 типов) и меньшая — в СП (3 типа), причем наибольшее количество гликопротеидов обнаруживается во фракции синаптических контактов (Morgan et al., 1973). При этом углеводные остатки гликопротеидов находятся на внешней стороне пре-СМ. Во фракции СП, чистоте которой так много уделяют внимания эти авторы, гликопротеиды отличаются высоким содержанием глюкозы (N-ацетилглюкозамин), в то время как в синаптической фракции в основном содержатся сиалогликопротеиды. В 1% додецилсульфатном экстракте фракции синаптических мембран мозга крыс при анодном электрофорезе выявлено 8 типов гликопротеидов (Bankeg et al., 1972). Опыты с использованием меченых предшественников гликопротеидов (глюкозамин или фукоза) в сочетании с электрофорезом в полиакриламидном геле свидетельствуют также о локальном синтезе гликопротеидов в синаптосомах, по крайней мере о трансформации простых белков в сложные. По данным Gurd и соавт. (1974), состав гликопротеидов (6—7 зон при электрофорезе) синаптических мембран коры крыс сходен с таковым микросом мозга, при этом митохондрии мозга практически не содержат гликопротеидов. Последние являются характерными белками

нейрональных мембран, в том числе и синаптических. Возможная функция этих белков состоит в межклеточном узнавании, в рецепции «своих» и «чужеродных» межклеточных белков (см. главу 5).

## НЕПРОСПЕЦИФИЧЕСКИЕ БЕЛКИ

Несомненными успехами последних лет являются открытие и изучение локализации свойств и функций нейроспецифических белков.

Наиболее изучен белок S-100. Этот водорастворимый кислый белок открыт Moore, McGregori в 1965 г. Название белка авторы объясняют его способностью растворяться в 100% насыщенном растворе  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  при pH 7,2—7,4. Отн. мол. м. белка S-100 равна  $21 \cdot 10^3$  (он состоит из 3 субъединиц). В белке содержится большое количество (до 30 моль%) кислых аминокислот — глутаминовой и аспарагиновой. Белок S-100 локализован в различных отделах головного мозга животных неравномерно. Больше всего этого белка обнаружено в мозжечке и белом веществе больших полушарий. Появление белка S-100 в лобной области коры совпадает в онтогенезе с возникновением электрической активности мозга животных. Белок S-100 локализован как в нейроглии, где он синтезируется, так и в нейронах, где присутствие его объясняется либо транспортом макромолекул из глии в нейрон, либо синтезом непосредственно в нейроне. Найден белок S-100 в нервной системе позвоночных и некоторых видов беспозвоночных, при этом серологически показано отсутствие видовой специфичности этого белка. Доля белка S-100 среди других белков мозга невелика и составляет 0,1—0,5%. В нервные окончания белок S-100 поступает из нейронов с медленным аксоцитом (Miani et al., 1967). Присутствие белка S-100 в синапсосомах коры мозга крыс, морских свинок доказано при помощи микроэлектрофореза его додецилсульфатного экстракта (В. С. Туровский и др., 1976) и иммунологическим методом (Donato et al., 1975). Последние авторы установили, что 85% белка S-100 в синапсосомах находится в растворимой форме, т. е. в цитоплазме, и 15% — в мембранно-связанной форме, в основном в СП и в меньшей степени — во фракции синаптических мембран. Связывание меченого йодом белка S-100 обратимо и требует наличия  $\text{Ca}^{++}$  и  $\text{Mg}^{++}$  в инкубационной среде. Связанный с синаптическими мембранами белок S-100 легко экстрагируется пентанолом. Са-зависимое связывание белка S-100 также характерно и для фракции СП. По иммунологическим данным, полученным в лаборатории Хидена (Haglid et al., 1974), после инкубации кроличьей антисыворотки к белку S-100 мозга быка (конъюгированной с пероксидазой хрена) со срезами коры мозга и мозжечка кроликов установлено наличие белка

S-100 в большей степени в пост-СМ и в меньшей степени в пре-СМ, что, по мнению авторов, указывает на возможность секреции белка S-100 терминалями при возбуждении.

Важными свойствами белка S-100 являются химическая гетерогенность, заключающаяся в различии аминокислотных последовательностей и скоростей обмена; существование в различных агрегационных формах в зависимости от концентрации  $\text{Ca}^{++}$  в среде; высокое сродство к  $\text{Ca}^{++}$ , обусловленное наличием триптофана, фенилаланина, тирозина или SH-групп цистеина. В опытах с липосомами, образованными из фосфатидилсерина и фосфатидилхолина, показано связывание белка S-100, зависимое от  $\text{Ca}^{++}$ . В присутствии  $\text{Ca}^{++}$  при pH 7,6 (22°C) отмечается 2 участка связывания с  $K_{дисс}$   $5 \cdot 10^{-5}$  М и  $1 \cdot 10^{-3}$  М. Избирательное связывание  $\text{Ca}^{++}$  с первым участком в присутствии  $\text{K}^+$  индуцирует конформационные изменения гидрофобных групп белка S-100 в липосомах, которые в свою очередь увеличивают проницаемость для некоторых катионов (например, для  $\text{Rb}^+$ ). В этих условиях белок S-100 становится более липофильным (Calissano et al., 1974). Избирательное связывание белка S-100 с  $\text{Ca}^{++}$  позволило Hyden (1974) предположить особую (тропонинподобную) роль этого нейроспецифического белка в системе сократительных белков синапса при секреторных процессах. По данным Hyden, белок S-100 обладает высокой скоростью обмена, однако Моогге определил, что  $\tau_{50}$  равна 16 дням. Это несовпадение объясняется тем, что препараты белка S-100 могли отличаться по химическим и агрегационным свойствам. Белок S-100 активирует РНК-полимеразу-1 фракции ядер мозга эмбрионов цыпленка (Michetti et al., 1976). По данным Hyden (1974), при обучении крыс наблюдается повышение содержания и скорости обмена белка S-100 в морском коньке мозга. Эти и другие перечисленные выше данные указывают на особую функциональную значимость этого белка. Антисыворотка против белка S-100, введенная внутрь желудочков мозга животных, блокирует поведенческие реакции.

Вторым нейроспецифическим белком является белок 14-3-2, который открыт Моогге в 1969 г. Название этого белка, как и других нейроспецифических, связано с его характеристикой при хроматографической очистке. Большая часть белка локализована в нейронах, а не в нейроглии. Отн. мол. м. этого белка в форме мономера равна  $38-39 \cdot 10^3$ . В нейронах он существует в форме димеров, образованных с участием SH-групп цистеина; содержит большое количество кислых дикарбоновых аминокислот, а также пролина (больше, чем белок S-100). Белок 14-3-2 появляется в мозге крыс лишь на 5-й день после рождения. В сером веществе этого белка больше, чем в белом. В терминали белок 14-3-2 поступает с медленным аксотомом. Он обнаружен в цитоплазме синапсом и частично в СП мозга животных при помощи реакции связывания комплемента (Vosk et al.,



1975). По некоторым данным (Goldstein et al., 1972), белок 14-3-2 может отвечать за новообразование ферментов, участвующих в синтезе катехоламинов и серотонина.

Остальные нейроспецифические белки относятся к кислым гликопротеидам. Кислый гликопротеид 10В, открытый Bogoch в 1969 г., содержит гексозу, гексозамин и нейраминную кислоту. Он гетерогенен по структуре и содержанию углеводных компонентов. В нейроглии этого белка больше, чем в нейронах. При обучении в мозге голубей изменяется количество гликопротеида 10В. В связи с тем что этот белок локализуется в синаптических мембранах, предполагается его участие в механизмах памяти.

Во фракции синаптических мембран мозга крыс выявлен и другой нейроспецифический кислый гликопротеид — сialogликопротеид GP-350 с отн. мол. м.  $11,6 \cdot 10^3$ , который мигрирует по аксону в терминаль с быстрым аксотоком. Данный гликопротеид локализуется только во фракции синаптосом (максимум в ткани зрительного бугра) и отличается высокой интенсивностью обмена ( $t_{50} = 18-19$  ч) (Van Nieuw Amerongen et al., 1974). Во фракции синаптических мембран мозга животных локализован также растворимый нейроспецифический гликопротеид GM-50-с с отн. мол. м.  $14,5 \cdot 10^3$  (Ramirez et al., 1974). Функция этих гликопротеидов в синапсах пока неизвестна.

#### ИММУНОСПЕЦИФИЧНОСТЬ БЕЛКОВ

Для доказательства органоспецифических свойств белков мозга, в частности синаптических структур, успешно используются иммунологические методы исследования. В опытах с кроличьей антисывороткой против синаптосом коры или мозжечка крыс гистоиммунологически показано (Kognguth et al., 1969), что меченые флюоресцирующие антитела дают гомологичную реакцию с синаптосомами головного мозга и менее выраженную с синаптосомами спинного мозга крыс. Гомологичные антигены локализованы в активной зоне синапсов. Время полужизни ( $t_{50}$ ) кроличьих антител к фракции синаптических мембран коры мозга крыс составляет 7,4 сут. Антисыворотка к фракции синаптических мембран среднего мозга цыпленка не давала иммунохимической реакции с другими органами (печень, почки, селезенка) мышей, с эритроцитами цыпленка и реагировала только с мембранами терминалей и аксонов (Livett et al., 1974). Наличие органоспецифических антигенов в синаптических структурах отмечено многими исследователями. Антитела к фракции синаптических мембран не реагируют с антигенами миелинов, митохондрий мозга и печени крыс (Miskey et al., 1971).

Антисыворотка к фракции синаптических мембран мозга животных участвует в реакции связывания комплемента только

с синапсосомами и фракцией синаптических мембран, но не дает соответствующей реакции с миелином, ядрами, СП, растворимыми белками митохондрий и мембранами других органов (Herschman et al., 1972). Обработка синапсосом нейраминидазой увеличивает серологическую реактивность синапсосом при действии антисыворотки. Антитела к соответствующим антигенам наружных мембран синапсосом в отсутствие комплемента активируют обратный захват ряда медиаторов (Raiteri, Levi, 1973).

Водорастворимые белки СП мозга крыс содержат до 5 специфических антигенов по сравнению с другими субъединицами синапсосом. Нейроспецифический антиген С-1 локализован исключительно во фракции СП, а антигены D-1, D-2 и D-3 — во фракции синаптических мембран (Vock et al., 1974, 1975). Эти антигены отсутствуют в астроцитах. В мозге новорожденных крыс во фракции синаптических мембран также обнаруживается высокое содержание антигена С-1 («синаптина», по предложению авторов). По-видимому, присутствие С-1 в этой фракции свидетельствует либо о ее недостаточной чистоте, либо о том, что синаптин на данной стадии развития животных входит в состав синаптических мембран.

Антисыворотка против СП электрического органа ската реагирует с двумя основными и двумя минорными антигенами, имеющимися также и во фракции синаптических мембран (Ulman, Whittaker, 1974). Однако авторы не обнаружили иммунопреципитации данной антисыворотки с растворимыми белками СП ската, содержащими везикулин, и с антигенами фракций СП мозга млекопитающих и хромоаффинных гранул надпочечников. Wildlund и соавт. (1974) выявили два специфических антигена в препаратах СП электрического органа ската, отличных от антигенов других субклеточных фракций ткани органа. Антисыворотка против хромоаффинных гранул надпочечников быка дает иммуногемологическую реакцию с адренергическими СП и периферических нервов, в основном в отношении хромогранина и дофамин- $\beta$ -гидроксилазы (Hörtnagl et al., 1972).

Перспективен подход некоторых исследователей к изучению влияния антисывороток против синапсосом или их субъединиц на ультраструктуру синапсов и показателей функций ЦНС. В присутствии комплемента антитела к синапсосомам мозга морской свинки увеличивают проницаемость мембран нервных окончаний (Raiteri et al., 1972); антитела к фракции синаптических мембран коры мозга кошек (или кроликов) вызывают цитолитический эффект в синапсосомах мозга кошек либо в ганглиях моллюсков, приводя к набуханию СП, их ассоциации и последующему исчезновению в цитоплазме терминали (de Robertis et al., 1968). Введение в желудочки мозга кроликов гомологичных антител к фракции синаптических мембран коры мозга вызывает эпилептиформную электрическую активность, при

этом нормализация активности наступала спустя неделю. В этом случае антитела к фракции галактоцереброзидов, выделенных из синаптических мембран мозга кроликов, не приводили к описанному выше эффекту (Proctor-Bowen et al., 1971). Фокальную эпилептиформную активность мозга животных вызывают также введением в мозг антисыворотки к фракции синаптических мембран наружного коленчатого тела или к актомиозинподобному белку синаптосом (Bowen et al., 1976).

#### ОСОБЕННОСТИ БЕЛКОВО-ЛИПИДНОЙ СТРУКТУРЫ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

На особенности структуры пре- и пост-СМ указывают прежде всего данные об ультраструктуре синапсов, химизме процессов синаптической передачи, белково-липидном составе. Иммунологическим методом показано, что нейрональные, синаптические поверхностные антигены локализованы только в определенных зонах (Rostas, Jeffrey, 1975). Состав и структура нейрональных мембран в зоне аксонного холмика, «середины» аксона и сомы нейрона, по-видимому, различны. В частности, это установлено в отношении распределения ионных каналов в мембранах гигантского нейрона аплизии (Kado, 1973). Изучение температурной зависимости связывания конканавалина А с рецептором показало, что во фракции синаптических мембран липиды при физиологических температурах находятся в жидкой фазе (Matus et al., 1973). Исследование собственной флюоресценции аминокислот и ядерного парамагнитного резонанса при использовании фракций синаптических мембран коры мозжечка теленка выявило, что синаптические мембраны являются более «жидкими», чем внесинаптические, например аксональные (Hoss, Abood, 1974). По данным этих авторов, вязкость белков синаптических мембран примерно на порядок ниже известных значений вязкости двухслойных липидных областей мембран нерва. Исследование кругового дихроизма в области 223—224 нм фракции синаптических мембран зрительного бугра, мозжечка быка указывает на то, что синаптические мембраны различного происхождения построены почти однотипно (Kornuth et al., 1971). Спектры кругового дихроизма, зависящие от состава ионной среды, рН и температуры, для фракций СП, синаптических мембран и миелинов, как и следовало ожидать, отличаются друг от друга. По данным С. В. Конева и соавт. (1975), цАМФ индуцирует быстрые структурные перестройки во фракции синаптических мембран мозга быка, о чем судили по значениям интенсивности собственной флюоресценции и спектру кругового дихроизма. Синаптический контакт устойчив при обработке ткани мозга трипсином и химотрипсином, но может разрушаться при действии пепсина и проназы.

Waelsch (1957) предположил возможность локального синтеза белка в аксоне, однако доказательства были получены лишь в 1966—1968 гг. (А. Н. Мезенцев, О. В. Мессина, 1971). При радиоавтографических исследованиях на системе нейрон — аксон отмечено включение меченых аминокислот в аксон на ранних стадиях инкубации, однако этот уровень затем маскировался волной радиоактивности, поступающей из тела нейрона. Можно полагать, что включение метки в белок аксоплазмы (и аксолеммы) начинается в более поздние сроки, чем миграция белка по нерву. РНК, по-видимому, начинает синтезироваться раньше. При инкубации сегментов периферического нерва *in vitro* (т. е. при исключении роли аксотока) или при введении меченых предшественников в децентрализованный нерв *in situ* обнаружена высокая степень обмена белков аксоплазмы и мембранных оболочек.

Доказана локализация синтеза в аксоплазме, аксолемме и леммоцитах. Относительная доля каждого компонента синтеза оставалась неясной. Сначала предполагали, что основным, если не решающим, компонентом является леммоцит, из которого синтезированные белки могут поступать в аксон. Последующие опыты показали наличие синтеза белка в изолированных аксонах, лишенных сателлитных клеток (Lasek, 1970). Интенсивность синтеза в этих случаях уменьшалась, т. е. роль леммоцитов в собственном синтезе аксона была весьма значительной. На важность локального синтеза в аксоне может указывать тот факт, что двигательный нейрон рака был возбудим в течение 100 дней после децентрализации и способен секретировать медиаторы (Ной et al., 1967).

Локальный синтез является РНК-зависимым, так как актиномицин D вызывает торможение включения меченых аминокислот в белки аксона. В опытах с ингибиторами белоксинтезирующей системы установлено, что локальный синтез в большой степени немитохондриальный. Скорость синтеза структурных белков оболочек аксона выше, чем таковая для белков аксоплазмы. Возникает дилемма: синтез белка идет по рибосомному типу, осуществляется в сателлитных клетках и далее белки поступают в аксон либо синтез белка в аксоне является нерибосомным, так как явно оформленных полисом в аксоплазме электронно-микроскопическими исследованиями не обнаружено. Определенно ответить на этот вопрос пока не удастся.

Синтез белка в аксоне зависит от энергетического обеспечения. Ингибиторы дыхания и окислительного фосфорилирования, аноксия приводят к торможению скорости локального синтеза белка в препаратах аксона.

Учитывая, что фонд свободных аминокислот в аксонах млекопитающих невелик, а содержание протеолитических фермен-

тов большее (Marks, Lajtha, 1970), можно предполагать, что в самой аксоплазме происходит расщепление белков протеазами и затем осуществляется синтез необходимых для аксона белков. Поскольку инъекция протеаз внутрь аксона кальмара приводит к заметному снижению ионной проницаемости и ТМП (Tasaki, 1969), возможно, что они имеют определенное функциональное значение. Феномен автономного синтеза белка в аксоне требует своего объяснения в рамках классической схемы ДНК — РНК — белок. РНК была впервые обнаружена в цитоплазме периферических нервов Edström и соавт. (1962). Общее содержание РНК в аксоне в 4 раза больше, чем в теле нейрона (Koenig, 1967). Сюда входит РНК как аксоплазмы, так и оболочки аксона, т. е. аксолеммы и окружающих аксон глиальных клеток. Суммарная РНК аксона определяется как рРНК с соотношением оснований А/Г, равным 0,57. РНК аксона гетерогенна. При фракционировании РНК седалищного нерва удается дифференцировать пики РНК с константой седиментации: 4S, 18S, 28S (Bгау, Austin, 1968). В аксоплазме маутнеровского нейрона количество РНК составляет 50%, остальное приходится на миелиновые оболочки. Однако большинство исследователей считают, что РНК значительно больше в оболочках аксонов, чем в аксоплазме. Синтез РНК в препаратах демиелинизированных аксонов является ДНК-зависимым. Установлено, что синтез РНК, чувствительной к РНК-азе, не тормозится актиномицином, а синтез РНК, устойчивой к РНК-азе и содержащей около 90% всей радиоактивности, тормозится актиномицином на 60%. По данным Кoenig (1967), высокообменивающаяся мРНК локализована в аксолемме и способна гибридизоваться с ДНК. Актиномицинзависимый синтез РНК обнаружен также для сегментов аксона маутнеровского нейрона, причем для инкубации использовали отрезок нерва, полностью освобожденный от окружающих глиальных клеток (Edström et al., 1969). В этом случае скорость обмена РНК в изолированном аксоне при пересчете на 1 мг РНК в 10 раз превышала таковую в перикарионе. Для объяснения приведенных данных предположены три гипотезы: 1) существуют еще не обнаруженные «текущие» с аксотоком ДНК и матричные РНК; 2) синтез происходит в митохондриях; 3) матрицей для синтеза РНК является ДНК ядра сателлитных клеток нейроглии. Большинство исследователей придерживаются последней гипотезы, но, признавая ее, делают еще одно предположение об особой циркуляции макромолекул из нейроглии в аксон (готовая высокомолекулярная РНК) и из аксона в клетки глии (предшественники синтеза РНК). Исследования Кoenig (1965, 1967) указывают на локальный синтез ацетилхолинэстеразы в аксонах. Синтез в подъязычном нерве кошки обеспечивает примерно половину содержания фермента. Доказательством того, что синтез протекает *de novo*, являются эффекты блокаторов синтеза белка: пурамицина, 5-фтороротовой

кислоты и РНК-азы. Все они полностью подавляют восстановление синтеза фермента, необратимо инактивированного введением кошкам диизопропилфторфосфата. При аппликации актиномицина D на сегмент аксономированного нерва, обработанного диизопропилфторфосфатом, наблюдается парадоксальный эффект: количество ацетилхолинэстеразы, синтезированной в нерве, значительно увеличивается по сравнению с содержанием ее в нерве, не подвергшемся действию актиномицина. Эффект актиномицина строго локален и полностью снимается действием пурамицина и 5-фтороротата. Актиномицин D не оказывал стимулирующего эффекта на синтез фермента в демиелинизованном нерве. Парадоксальное действие актиномицина Коениг объясняет по аналогии с подобным действием ингибитора на синтез адаптивных ферментов печени после гормональной индукции, т. е. блокадой синтеза репрессора мРНК.

### ЛИЗОСОМНЫЕ ФЕРМЕНТЫ

Фонд свободных аминокислот в цитоплазме нервных окончаний объясняется наличием активного транспорта аминокислот из межклеточной среды через аксональные и пре-СМ или действием протеаз, которые могут поступать в терминали с аксономом (Marks et al., 1970). Во-первых, в нервных окончаниях, по данным электронной микроскопии, обнаруживаются лизосомоподобные гранулы диаметром до 0,25—0,3 мкм. Во-вторых, гистохимические данные указывают на наличие кислой фосфатазы в нервных окончаниях и, в частности, возле активной зоны синапсов (Sood, Tewari, 1967). В препаратах синапсом мозга животных биохимическими методами обнаруживается активность типичных лизосомных ферментов, а именно арилсульфатазы, кислой фосфатазы,  $\beta$ -галактозидазы, N-ацетил-D-глюкуронидазы, нейтральной протеинкиназы. Может быть, свойства синаптических эндогенных протеаз «необычные», поскольку синаптические структуры устойчивы к действию экзогенных протеаз (Bagantes, Lunt, 1970). При инкубации синапсом при pH 5,0 (37 °C) наблюдается значительная активация  $\beta$ -галактозидазы и N-ацетилглюкозаминидазы. В гипотонических растворах солибилизируются арилсульфатаза и  $\beta$ -галактозидаза (Verity, Gade, 1973).

### НУКЛЕИНОВЫЕ КИСЛОТЫ

В синапсомах мозга крыс содержание РНК составляет 12—16%, ДНК — 0,4% и белка — 20% по сравнению с общим количеством их в гомогенате (Austin, Morgan, 1967; Balazs, Cocks, 1967). Наличие РНК показано во фракциях синаптических митохондрий и синаптических мембран. Большая часть суммарной РНК обнаруживается в синаптических митохондриях. В очищен-

ной фракции синаптических мембран целого мозга крыс обнаружены небольшие количества РНК и частично ДНК (Levitan et al., 1972).

Функция мембранной РНК остается не совсем ясной. Можно предполагать участие РНК синаптических мембран как в локальном синтезе белков, так и в межклеточном контакте. Характерными особенностями РНК клеточных мембран являются связанность их в мембранах с липопротеидами или с углеводными компонентами, устойчивость к воздействию РНК-азы, высокий уровень метилирования и наличие в составе нуклеотидов ГЦ-типа. В синаптосомах обнаружена РНК-метиلاза (Simon et al., 1967).

Установлено, что синаптосомы мозга золотой рыбки содержат рибосомную, транспортную РНК, а также РНК, отличную по седиментационным характеристикам от ядерной и цитоплазматической РНК, причем синаптосомная РНК связана в мембранных структурах (Shashoua, 1973). Информационная РНК синаптосом мозга крыс локализована главным образом в синаптических митохондриях (DeLagco et al., 1975). Этот тип интенсивно обменивающейся РНК содержит большее количество полиадениловых сегментов, чем РНК цитоплазматических полисом. В лаборатории Хидена (Cipello, Hyden, 1975) в синаптосомах мозга крыс обнаружены транспортная 4S РНК с отн. мол. м.  $8,9 \cdot 10^4$ , сходная с соответствующей РНК митохондрий печени, и высокомолекулярная 60S РНК, свойства и функции которой пока не совсем ясны. Известно, что наиболее высокомолекулярной является ядерная 46S РНК с отн. мол. м.  $4,7 \cdot 10^6$ .

В синаптоплазме найдены значительные количества свободных нуклеотидов. Сведения о локальном обмене РНК синаптосом *in vitro* немногочисленны. По нашим данным, включение меченого оротата в РНК синаптосом мозга блокировалось смесью актиномицинов, что указывало на локальный синтез РНК в синаптосомах. Дезоксихолат натрия, разрушая мембранные структуры синаптосом, ингибирует включение предшественника в РНК. Низкие концентрации РНК-азы активировали, высокие — тормозили обновление РНК синаптосом. Активирующее действие РНК-азы объяснить пока трудно (Р. Н. Глебов, О. М. Поздняков, 1969). Меченый уридин при его инкубации с синаптосомами коры мозга крыс включается в 6S, 12S и 48S РНК. Радиоавтографический анализ показал, что меченый уридин включается в РНК синаптических митохондрий и до 50% в РНК синаптических мембран (England, Attarti, 1976).

#### ЛОКАЛЬНЫЙ СИНТЕЗ БЕЛКОВ В СИНАПТОСОМАХ

Предпосылками автономного синтеза белка и РНК в нервных окончаниях являются наличие фонда свободных аминокислот и нуклеотидов, лизосомных ферментов, высокая активность био-

энергетических процессов, а также матриц РНК. Значение локального синтеза белка в нервных окончаниях, естественно, уступает по объему белкам, поступающим в терминали с аксоном.

Косвенным доказательством возможности автономного синтеза белка и РНК в нервных окончаниях являются данные о довольно быстром обмене белков пре-СМ и синаптических митохондрий ткани мозга после внутримозговой инъекции меченых предшественников. Однако в этом случае не без основания допускается, что высокая степень обмена белков нервных окончаний обеспечивается очень быстрым компонентом аксоотока ( $\geq 400$  мм/сут).

Зависимое от температуры активное включение меченых аминокислот *in vitro* в белки фракции синапсом мозга животных наблюдали многие исследователи (Р. Н. Глебов, 1974; Austin, Morgan, 1968). Как правило, средняя скорость обмена белков свежесыведенных целостных синапсом несколько ниже, чем фракции митохондрий мозга.

Скорость обмена водорастворимых белков синапсом и скорость синтеза нерастворимых белков одинаковы, в то же время в митохондриях мозга наблюдается преимущественное включение предшественников в нерастворимые белки (Autilio et al., 1968). Липопротеиды синапсом обновляются медленнее таковых митохондрий или микросом мозга.

Важная информация получена при исследовании путей синтеза белка *in vitro* в синаптических структурах. После инкубации с меченой аминокислотой синапсомы разрушали осмотическим шоком и выделяли субфракции. Оказалось, что в цитозоле синапсом и СП обновление белков незначительное либо совсем отсутствует. В этих условиях, по одним данным, интенсивность обмена белков во фракции синаптических мембран несколько выше, чем в синаптических митохондриях (Autilio et al., 1968); по другим данным (Von Hungen et al., 1968; Ramirez et al., 1972), степень обновления белков в синаптических митохондриях выше, чем в синаптических мембранах.

Электронно-микроскопическими исследованиями в сочетании с радиоавтографией показано, что включение меченой аминокислоты в синапсомы *in vitro* происходит в синаптических митохондриях и пре-СМ (Cotman, Taylor, 1971). Приведенные выше данные указывают, что в нервных окончаниях существует два независимых типа локального синтеза: 1) митохондриальный, направленный на обмен структурных белков внутренних мембран митохондрий; 2) немитохондриальный, квазирибосомный (при отсутствии полисом в синаптоплазме), направленный на обновление структурных белков пре-СМ и, возможно, растворимых белков синаптоплазмы.

Известно, что митохондриальный тип синтеза белков, в том числе и в нервной ткани, имеет свои особенности: малая чувст-



вительность синтеза РНК к актиномицину D, особенно рРНК с константой седиментации 17S; основная масса белков митохондрий (растворимые белки и белки наружной митохондриальной мембраны) синтезируется в цитоплазме под ядерным контролем, локально же синтезируются в основном липопротеиды внутренних мембран митохондрий (15% белков митохондрий мозга); скорость обновления белков в митохондриях намного ниже, чем в рибосомах цитоплазмы; нечувствительность к РНК-азе объясняется непроницаемостью мембран для этого фермента.

Митохондриальный тип синтеза белков в синапсосомах подтверждается следующими факторами: а) система включения аминокислот *in vitro* не требует фракции рН-5-ферментов, транспортной РНК и микросом, экзогенной АТФ и АТФ-генерирующей системы (здесь могут быть относительно богатые эндогенные энергетические источники); б) отсутствие угнетения синтеза РНК-азой; в) уменьшение скорости синтеза белка в синапсосомах ингибиторами цикла Кребса и разобщителями окислительного фосфорилирования; г) чувствительность белоксинтезирующей системы синапсосом к левомецетину (хлорамфениколу) — типичному ингибитору синтеза белка в митохондриях. Некоторые исследователи показали относительную резистентность митохондрий мозга к левомецетину и повышенную чувствительность к ацетилциклогексимиду. По-видимому, тест на антибиотики не является совершенным в отношении различия митохондриального и рибосомного цитоплазматического синтеза белков. Нет существенного различия биосинтеза в синаптических и несинаптических митохондриях мозга. Если в очищенных препаратах митохондрий мозга встречаются типичные митохондриальные 55S или 70S рибосомы, то в недостаточно очищенной фракции митохондрий мозга присутствуют и цитоплазматические рибосомы 80S. Для синтеза необходима сохранность структурной организации мембран синапсосом. Это может иметь значение при объяснении факта снижения скорости синтеза белка в осмотически разрушенных синапсосомах. Немитохондриальный тип синтеза белка в синапсосомах доказывается следующими фактами: 1) наличие некоторого количества РНК во фракции синаптических мембран; 2) частичное торможение включения аминокислот в белки синапсосом актиномицином D; 3) торможение скорости обмена белков синапсосом и фракции синаптических мембран, выделенных после предварительной инкубации синапсосом с меченой аминокислотой, пурамицином, циклогексимидом или ацетилциклогексимидом — типичными блокаторами рибосомной цитоплазматической системы синтеза белка; 4) торможение включения аминокислот в белки синапсосом моноацетатом или NaF-блокаторами гликолиза. По данным радиоавтографии (Gambetti et al., 1972), <sup>3</sup>H-лейцин включается *in vitro* в основном в синаптические мембраны синапто-

сом и лишь на 20% в белки синаптических митохондрий; при этом левомецетин тормозит синтез суммарных белков синаптосом на 20%, но не влияет на обновление белков пре-СМ. По мнению Ramirez и соавт. (1972), основная часть аминокислот включается в три типа белков (по данным электрофореза в полиакриламидном геле) фракции синаптических контактов, т. е. немитохондриальный синтез белков в нервных окончаниях, если он и происходит, осуществляется главным образом в активной зоне пре-СМ. Gilbert (1972) изучил включение меченых аминокислот непосредственно во фракцию синаптических мембран мозга животных. По его данным, условиями такого включения являются наличие в инкубационной среде  $Mg^{++}$ , АТФ, ГТФ и ферментного фактора из целостных синаптосом, а также определенное соотношение  $Na^+$  и  $K^+$ . В оптимальных условиях обмен мембранных белков тормозится РНК-азой, пурамицином и циклогексимидом и не зависит от левомецетина, убаина и КСН. Gilbert отмечал также, что профиль обменивающихся белков фракции синаптических мембран при электрофорезе в полиакриламидном геле отличен от такового белков микросом мозга.

Электронно-микроскопические исследования в сочетании с радиоавтографией выявляют в препаратах синаптосом мозга животных следовые количества фрагментов цитоплазматической сети (Morgan, 1970; Jones et al., 1975). Эти факты заставляют пока с осторожностью судить о возможности немитохондриального пути синтеза в нервных окончаниях. Кроме того, гипотеза о нерибосомном пути немитохондриального синтеза белка в синаптосомах (Р. Н. Глебов, 1970, и др.) не подтверждается имеющимися в данный момент фактами<sup>1</sup>. Характер обновления белков синаптосом *in vitro* изучали при помощи электрофореза додецилсульфатного экстракта в полиакриламидном геле. На денситограммах обнаружено до 8 максимумов радиоактивности с отн. мол. м.  $25-222 \cdot 10^3$  (Goldberg, 1973).

Ионы являются модуляторами биосинтетических процессов. Цитоплазматический синтез белков в любых клетках требует  $Mg^{++}$  (5—15 мМ) и  $K^+$  (50—100 мМ), причем  $Mg^{++}$  может быть заменен на  $Ca^{++}$  и  $Mn^{++}$ , а  $K^+$  — на  $NH_4^+$ ,  $Rb^+$  и  $Cs^+$ , в то время как  $Na^+$  и  $Li^+$  тормозят рибосомную систему синтеза. Эти закономерности характерны и для ткани мозга. Известно также, что  $K^+$  играет важную роль в полимеризации РНК. Под влиянием эндогенной РНК-азы может нарушаться связывание клеточными структурами как  $K^+$ , так и  $Ca^{++}$ . Учитывая, что при возбуждении нервных окончаний резко меняется ионный состав, ионы (особенно  $Ca^{++}$ ,  $K^+$  и  $Na^+$ ) могут быть эффективными регуляторами локального синтеза белка в нервных окончаниях. По данным экспериментов (Р. Н. Глебов и др., 1971; Appel et al.,

<sup>1</sup> Появилось сообщение Carlin (1977) о возможности ферментного нерибосомного синтеза тропониноподобных белков в синаптосомах мозга крыс.

1969; Goldberg, 1971), можно отметить следующие закономерности. Интенсивность обмена белков синапсом мозга животных зависит от скорости активного транспорта меченых аминокислот через пре-СМ, т. е. от фонда свободных предшественников в синаптоплазме. Максимальная степень обмена белков синапсом наблюдается в изотонической буферно-солевой среде, содержащей  $\text{Na}^+$  (50—100 мМ) и  $\text{K}^+$  (10—20 мМ), т. е. в среде, оптимальной для функционирования  $\text{Na, K-ATP-азы}$ , связанной с активным транспортом аминокислот. Значение активного транспорта аминокислот *in situ* в локальном синтезе белков нервных окончаний пока не ясно. При деполяризации пре-СМ активный транспорт может быть заторможен (см. главу 7). Более важна при деполяризации пре-СМ регуляция  $\text{Ca}^{++}$  синтеза белков. Действительно, усиленное поступление  $\text{Ca}^{++}$  внутрь терминалей при их деполяризации может приводить к активации поглощения  $\text{Ca}^{++}$  синаптическими митохондриями. Вследствие этого усиливается поглощение митохондриями субстратов цикла Кребса, в основном сукцината. Количество ресинтезируемой АТФ благодаря использованию в качестве субстрата янтарной кислоты многократно возрастает, так как окисление сукцината протекает значительно быстрее, чем окисление других субстратов цикла Кребса. Значительные количества АТФ, появляющиеся в терминали, могут расходоваться не только в процессе секреции, но и на биосинтез белков. На основании этого можно полагать, что при деполяризации нервных окончаний локальный синтез белков должен быть уве-

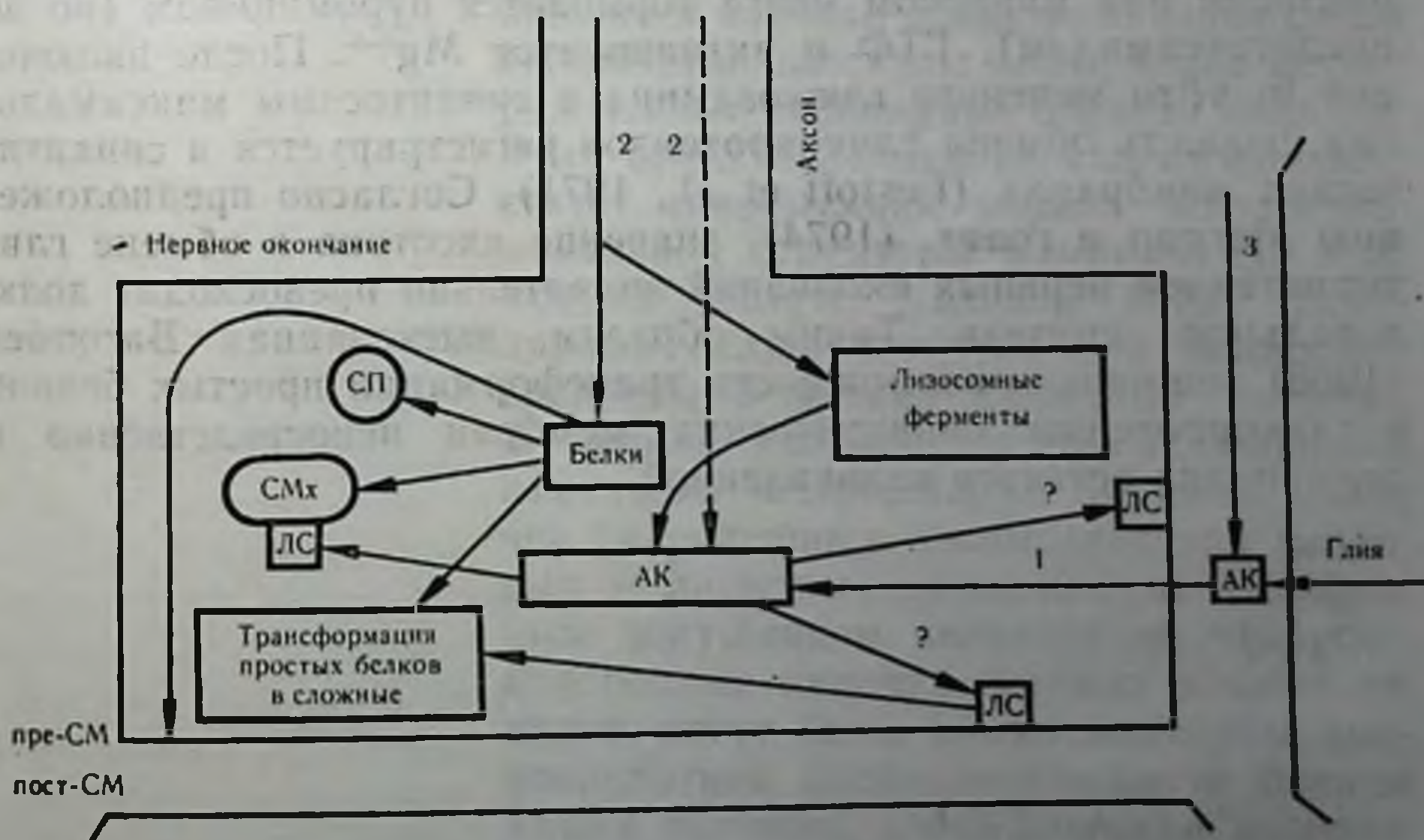


Рис. 10. Пути локального синтеза белка в нервных окончаниях.

СМх — синаптические митохондрии; АК — аминокислоты; ЛС — локальный синтез; 1 — активный транспорт; 2 — аксоток; 3 — межклеточная среда.

личным. В нашей лаборатории (Р. Н. Глебов и др., 1976) при стимуляции электрическим током (100 Гц, 30 мин) синапсом коры мозга крыс в растворе Кребса — Рингера выявлено увеличение (на 60%) включения смеси меченых аминокислот в белки. В регуляции белоксинтезирующей системы синапсом могут принимать участие цАМФ и, возможно, протеинкиназа, поскольку в наших опытах обнаружено, что цАМФ в концентрации 0,1 мМ увеличивает включение  $^3\text{H}$ -лизина в белки синапсом коры мозга крыс (на 60%).

Функциональная значимость локального синтеза белков в нервных окончаниях пока не ясна. Можно предполагать участие этого процесса в обеспечении пластических функций мембранных структур нервных окончаний при функционировании синапсов (рис. 10).

Как уже отмечалось, состав гликопротеидов СП и во фракции синаптических мембран мозга животных различен. В составе СП имеются в основном низкомолекулярные гликопротеиды, содержащие в своей структуре преимущественно маннозу и глюкозамин; в синаптических мембранах встречаются в основном высокомолекулярные гликопротеиды, содержащие фукозу, сиаловые кислоты, маннозу, галактозу и в меньшей степени глюкозамин.

В синапсосамах обнаружены ферменты синтеза гликопротеидов и гликолипидов. Галактозил- и маннозилтрансфераза локализована преимущественно в синаптических мембранах мозга крыс (Vroquet et al., 1971). Авторы отмечают, что перенос маннозы с ГДФ-маннозы на эндогенные гликопротеиды синапсом или микросомом мозга тормозится пурамицином (но не циклогексимидом), ГТФ и активируется  $\text{Mg}^{++}$ . После включения *in vitro* меченого глюкозамина в синапсосомы максимальная скорость обмена гликопротеидов регистрируется в синаптических мембранах (Festoff et al., 1971). Согласно предположению Moggan и соавт. (1974), значение аксотока в обмене гликопротеидов нервных окончаний значительно превосходит долю локального синтеза. Таким образом, высказанная Bagondes (1968) гипотеза о возможности трансформации простых белков в гликопротеиды синаптических мембран непосредственно в терминалях остается недоказанной.

## 5. Обмен липидов в синаптических структурах

---

### СТРУКТУРА МЕМБРАН И ВОЗБУДИМОСТЬ

Согласно гипотезе Hechter (1965), мембрана в состоянии покоя представляет высокоорганизованную структуру, в которой липидный слой упорядочен, а вода обладает гексагональным, льдоподобным строением. При деполяризации белковые компоненты принимают более глобулярную форму, липиды и вода теряют свою упорядоченность, в результате чего ослабляются гидрофобные взаимодействия. Катионы свободно проходят через появившиеся каналы, представляющие собой подвижные молекулы воды, через неупорядоченные неполярные области липидов. Этим представлениям во многом соответствует современная модель жидкостно-мозаичной структуры мембран. По этой модели (Singer, Nicolson, 1972) глобулярные белки частично или полностью внедрены в вязкий липидный матрикс. В модели учитывается также фазность изменений конформации липидов, наличие гидрофобных взаимодействий белковых и липидных компонентов. Интересным допущением является то, что углеводородные цепочки жирных кислот липидов могут быть комплементарны аминокислотной последовательности белков. Таким образом, специфическая ассоциация мембранных белков с липидами может быть генетически детерминирован-

ной. Активность мембранных ферментов в значительной мере зависит от агрегатного состояния липидов. Мембранные белки разделяют на три класса: 1) белки, связанные с липидами электростатически и находящиеся на поверхности мембран; 2) белки, связанные с липидами гидрофобными силами; 3) белки (например, гликопротеиды), пронизывающие мембрану насквозь и взаимодействующие с липидной фазой также гидрофобными связями. Доля липидов, связанных с белками, не превышает 30% от общего количества липидов мембран.

## ХОЛЕСТЕРИН, ЦЕРЕБРОЗИДЫ И СУЛЬФАТИДЫ

Холестерин является возможным регулятором подвижности гидрофобных углеводородных «хвостов» липидов мембран: в области «сверхуплотнения» холестерин разрыхляет, т. е. делает менее плотной, упаковку хвостов; в области «сверхразрыхления» — наоборот, уплотняет мембрану. Наиболее высокое содержание холестерина в мозге отмечается в клеточных мембранах (фракции синапсом, микросом и миелина) и наименьшее — в митохондриях. Во фракции аксональных мембран, свободных от миелиновых фрагментов, содержится 30—40% липидов, в их числе 37% составляют фосфолипиды, 14% — холестерин и 22% — гликолипиды (Norton, Turnbull, 1970). Молярное отношение суммарных фосфолипидов к холестерину в различных нейрональных мембранах примерно одинаково и составляет для синапсом мозжечка кошки, коры мозга крыс 1,6—2,0, для фракции синаптических мембран — 1,4—1,7, для СП — 1,2—1,6 (Breskenbridge et al., 1973).

Синтез холестерина происходит в основном в теле нейрона, а в терминали он поступает с аксотоком. После введения в цистерну мозга крыс 4-<sup>14</sup>C-холестерина наиболее интенсивный обмен наблюдается в ядрах, синапсомах и микросомах, наименее интенсивный — в митохондриях и миелине. Высокой степенью обмена холестерина обладают синапсомы и при введении 24-<sup>3</sup>H-церебростерина (Lin, Smith, 1975). Эти опыты указывают на возможность быстрого аксотока холестерина в нервные окончания либо на возможность его локального синтеза в синапсах.

Цереброзиды и сульфатиды являются характерными гликолипидами мозга. Цереброзиды состоят из аминспирта, содержащего жирную кислоту, ацилирующую NH<sub>2</sub>-группу, и гексозного компонента (галактоза, реже — глюкоза). В состав цереброзидов мозга входит до 60 компонентов, он очень variabelен благодаря различию жирных кислот и длинноцепочечного аминспирта. Церамид — сфингозин, содержащий жирные кислоты, но не содержащий гексозы, является важным компонентом ганглиозидов. Сульфатиды — это сульфоцереброзиды, в которых

сульфат соединен эфирной связью с третьим углеродным атомом галактозы. Как правило, сульфатиды в ткани мозга млекопитающих составляют 10—20% от общего числа цереброзидов. Во фракции миелиновых фрагментов цереброзидов и сульфатидов больше, чем в синапсосомах, и значительно больше, чем в митохондриях мозга. Содержание обоих гликолипидов во фракции синаптических мембран или синапсосом значительно меньше, чем ганглиозидов. Во фракции СП цереброзиды и сульфатиды практически отсутствуют (Morgan, 1973).

Цереброзиды синтезируются в мембранах мозга при действии сфингозина, УДФ-галактозы и ацил-КоА. Сульфатиды синтезируются сначала в цитоплазме клеток из АТФ и сульфата аденозин-5-фосфосульфата, который фосфорилируется в фосфоаденозин-5-фосфосульфат; продолжается синтез в мембранах.

Максимальные активности ферментов синтеза сульфатидов обнаружены в синапсосомах и микросомах мозга мышей (Nussbaum, Mandel, 1972).

Учитывая большую вариабельность состава гликолипидов (прежде всего цереброзидов и сульфатидов) в клеточных мембранах, а также их иммунную активность, Roseman (1970) предположил, что с ними связано «межклеточное узнавание». Эта идея получила широкое признание, хотя природа «узнавания» на поверхности (или в примембранных слоях) клеточных, в том числе и синаптических, мембран пока еще не выяснена.

К «узнающим системам» клеточных мембран, помимо гликолипидов, относятся гликопротеиды, мембранная высокометилированная РНК, гиалуроновая кислота, хондроитинсульфат и гепарин. При введении *in vivo* в мозг крыс  $^{35}\text{S}$ -сульфата включение метки в синапсосомах было максимальным в гликозамингликаны, состоящие из гиалуроновой кислоты, слабее — в хондроитинсульфаты, гепаринсульфаты, а в микросомах — наоборот, скорость обмена была максимальной в хондроитинсульфатах (Saxena et al., 1971).

## ГАНГЛИОЗИДЫ

Эти кислые липиды, впервые открытые в 1941 г., относятся к гликолипидам, точнее к гликосфинголипидам (С. Ю. Туманова, 1975). Ганглиозиды состоят из метаболически малоактивной гидрофобной (церамид и жирные кислоты) и метаболически высокоактивной гидрофильной, олигосахаридной (глюкоза, галактоза, N-ацетилгалактозамин и N-ацетилнейраминовая или сialовая кислота) частей. В составе сфингозинового основания (церамида) имеются аминоспирты с 18 и 20 атомами углерода. Жирные кислоты, преимущественно насыщенные, имеют 16—22 атома углерода и содержат большое количество (до 80—90%) стеариновой кислоты. Олигосахаридный компонент

ганглиозидов (количество сахаридов от 2 до 9) обеспечивает большое их разнообразие. В настоящее время выделено (в основном из нервной ткани) до 12 различных ганглиозидов, которые разделяются на моно-, ди-, три-, тетра- и пентасиалоганглиозиды. В ткани мозга млекопитающих наиболее широко представлены 5 типов (до 90%) ганглиозидов (табл. 4).

Таблица 4

Классификация ганглиозидов мозга (по Svennerholm, 1963)

Условные обозначения	Строение	Общее название
G <sub>M1</sub>	Гал-Нацг-гал-глю-цер   НАНК	Моносиало-N-тетраглюкозил-церамид
G <sub>D1a</sub>	Гал-Нацг-гал-глю-цер            НАНК    НАНК	Дисиало-N-тетраглюкозилцерамид
G <sub>D1b</sub>	Гал-Нацг-гал-глю-цер   НАНК-(8→2)-НАНК	Дисиало-N-тетраглюкозилцерамид
G <sub>T1b</sub>	Гал-Нацг-гал-глю-цер            НАНК    НАНК—НАНК	Трисиало-N-тетраглюкозилцерамид
G <sub>T1a</sub>	Гал - Нацг - гал - глю - цер                        НАНК—НАНК    НАНК	Трисиало-N-тетраглюкозилцерамид

Примечание. Гал — галактоза, глю — глюкоза, Нацг — N-ацетилгалактозамин, НАНК — сиаловая кислота, цер — церамид.

Ганглиозиды в отличие от других липидов растворимы не только в органических растворителях, но и в воде, где они образуют мицеллы с отн. мол. м. от 2—8·10<sup>4</sup>. Лабильная полимерная третичная структура ганглиозидов образуется за счет водородных связей. Полимеры способны к складыванию и спирализации, агрегации в упорядоченные и ориентированные системы. Структурное многообразие ганглиозидов имеет важное значение для функции.

Высокое содержание ганглиозидов характерно для коры мозга, мозжечка, хвостатого ядра и зрительного бугра животных. Количество ганглиозидов в нервной системе беспозвоночных очень мало. Содержание ганглиозидов в других тканях значительно ниже, чем в нервной ткани (исключение составляет мозговой слой надпочечников).

Ганглиозиды являются маркерными липидами клеточных мембран мозга, как нейронов, так и нейроглии. Многочисленными исследованиями установлено, что при субклеточном фрак-



ционировании ткани мозга ганглиозиды присутствуют в основном в синапсосомах и микросомах мозга, причем содержание их в синапсосомах (100 мкг на 1 мг белка) несколько выше, чем в микросомах (Lapetina et al., 1968). Качественный состав ганглиозидов в синапсосомах сходен с таковым в микросомах и клетках нейроглии (Hamberger, Svennerholm, 1971), причем в миелиновых фрагментах обнаруживается высокое содержание ганглиозида  $G_{M1}$ . Во фракциях ядер и митохондрий мозга, в том числе и синаптических митохондриях, в цитоплазме синапсосом, СП ганглиозиды практически отсутствуют (Morgan et al., 1973; Baker et al., 1975). Содержание ганглиозидов в синаптических мембранах несколько выше, чем в аксонах (Derikmenjian et al., 1969). Больше количество ганглиозидов, впрочем как и ферментов их синтеза, содержится в легких синаптических мембранах, чем в тяжелых (Di Cesage, Dain, 1972). Ранее отмечавшаяся локализация ганглиозидов во фракции СП объясняется примесями. На основании этих фактов гипотезу Виртон и соавт. (1964) о роли ганглиозидов в мембранах СП в механизме секреции медиаторов следует признать ошибочной. Таким образом, ганглиозиды в нейронах отсутствуют в свободном виде и связаны исключительно с нейрональными мембранами, в основном с синаптическими.

В ганглиозидах, выделенных из других тканей, N-ацетилгалактозамин, как правило, отсутствует. Он синтезируется из фруктозо-6-фосфата. Другой важный компонент ганглиозидов — сиаловая кислота — синтезируется из N-ацетил-D-маннозамина.

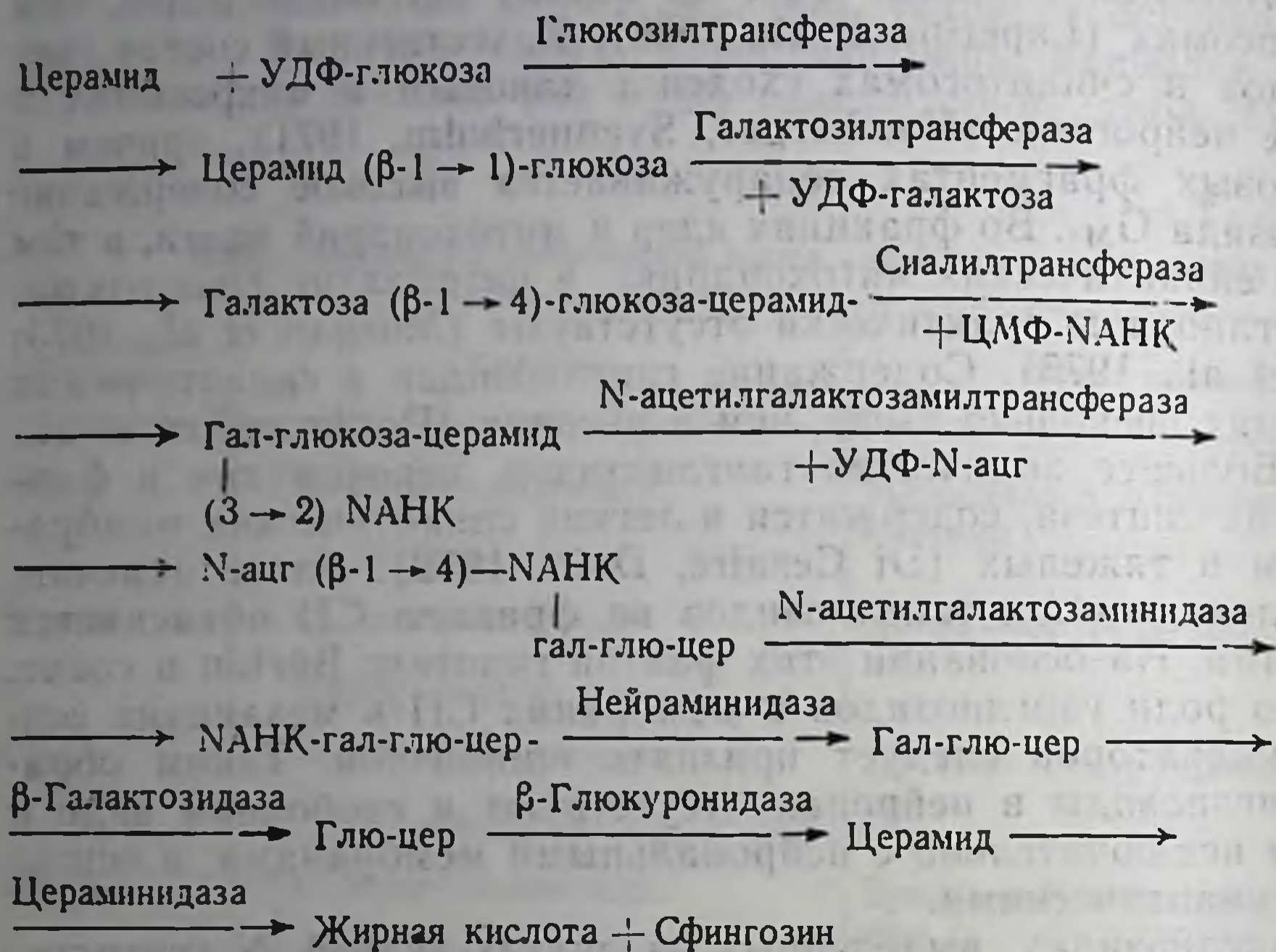
Синтез ганглиозидов является многоступенчатым процессом, протекающим при участии различных ферментов. Ниже приводится схема 2 синтеза и распада ганглиозидов.

Значение  $t_{50}$  для ганглиозидов синапсосом мозга крыс составляет 10—13 сут, а для суммарных ганглиозидов зрительной области коры мозга кроликов — 60 сут (Holm, Svennerholm, 1972). По интенсивности обмена ганглиозиды занимают одно из первых мест среди липидов. Предполагается, что ферменты биосинтеза ганглиозидов представляют единый мультиферментный ансамбль, локализующийся в мембранах.

Ферменты синтеза ганглиозидов — трансферазы — обладают максимальной активностью в микросомах мозга, особенно в синапсосомах. Активность синапсосомной галактозилтрансферазы оптимальна при pH 6,8 и активируется  $Mn^{++}$  (Hildebrand et al., 1970). Максимальная активность N-ацетилгалактозаминилтрансферазы определяется во фракции синаптических мембран мозга животных; фермент имеет оптимум pH 6,8—7,2 и активируется  $Mn^{++}$ , но не  $Mg^{++}$  и  $K^+$  (Di Cesage, Dain, 1971). Наличие высокой активности трансфераз в синапсосомах на фоне сравнительно небольшого фонда самих ганглиозидов в этой фракции указывает на локальный синтез этих липидов в синапсах и на возможную роль обратного аксотока в распространении ган-

## Схема 2

### Синтез и распад ганглиозидов



глиозидов в теле нейрона (Maccioni et al., 1971). Первая возможность доказывается опытами *in vitro* по включению меченого глюкозамина или ЦМФ-N-ацетилнейраминовой кислоты в ганглиозиды синапсом мозга животных (Agse et al., 1971). В опытах *in vivo* интенсивная скорость обмена ганглиозидов синапсом указывает на быстрый аксоток этих липидов в терминали (Maccioni, Carutto, 1968). М. И. Прохоровой и С. Ю. Тумановой (1975) показано, что при введении *in vivo* 2-<sup>14</sup>C-ацетата в синапсоммах мозга животных обновляются преимущественно ганглиозиды G<sub>D1a</sub> и G<sub>M1</sub>, а в миелине — G<sub>M1</sub> и G<sub>M2</sub>. Уабанин, ДНФ и гипоксия значительно снижают интенсивность обмена ганглиозидов мозга в опытах *in vivo*.

Если ферменты синтеза ганглиозидов локализованы в нервных окончаниях исключительно в синаптических мембранах, то ферменты распада распределены диффузно: в лизосомах и синаптических мембранах. Низкая активность  $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидазы в ткани мозга указывает на лимитирующую стадию катаболизма ганглиозидов. Мембранно-связанная  $\beta$ -галактозидаза расщепляет ганглиозиды, а цитоплазматический растворимый фермент расщепляет преимущественно цереброзиды. Максимальная активность  $\beta$ -галактозидазы и  $\beta$ -N-ацетилглюкозаминидазы (Cotman, Matthews, 1971) определяется во фракции синаптических мембран. Ферменты катаболизма ганглиозидов отсутствуют в очищенной фракции СП (Morgan et al., 1973).

Наиболее изучена нейраминидаза мозга. Конечным продуктом расщепления полисиалоганглиозидов при обработке нейраминидазой фракции синаптических мембран мозга является моносиалоганглиозид, который остается в структуре мембран. От моносиалоганглиозидов сиаловая кислота отщепляется нейраминидазой только после предварительного удаления N-ацетилгалактозамина (Schengrund, Rosenberg, 1970). Таким образом, наиболее легко сиаловые кислоты отщепляются от полисиалоганглиозидов. При обработке интактных синапсом нейраминидазой сиаловые кислоты высвобождаются в инкубационную среду. Нейраминидаза расщепляет и ганглиозиды, находящиеся в комплексе с белками мембран и в составе гликозаминогликанов. Скорость отщепления сиаловой кислоты от ганглиозидов синаптических мембран меньше, чем скорость синтеза ганглиозидов (Holm, Svennerholm, 1972). Максимальную активность нейраминидазы при субклеточном фракционировании ткани мозга до 60—80% определяют в синапсомах, особенно в синаптических мембранах (Di Cesage, Dain, 1972). Обработка синапсом морского конька крыс гиалуронидазой не вызывает заметных морфологических изменений в ультраструктуре синапсов, а обработка нейраминидазой приводит к уменьшению плотности пре- и пост-СМ и особенно синаптической щели (Bondareff, Sjöstrand, 1969). Инкубация синапсом коры мозга морской свинки с нейраминидазой приводит к снижению электрофоретической подвижности синапсом при рН 7,2, в то время как обработка трипсином, наоборот, увеличивает электрофоретическую подвижность этих структур (Bosmann, 1972).

Гистохимические опыты (Ramberg, Leblond, 1967), как и результаты обработки синапсом нейраминидазой, указывают на то, что сиаловая кислота находится на внешней поверхности синаптических мембран. Биохимически также доказано, что содержание ганглиозидов максимально во фракции синаптических контактов (Cotman et al., 1971). Церамидная часть молекулы ганглиозидов прочно связана гидрофобными связями с белками внутренней поверхности мембраны. Специфичность белкового связывания определяется жирнокислотным остатком ганглиозидов. Углеводородные цепи насыщенных жирных кислот, взаимодействуя между собой, способны образовывать плотную и стабильную упаковку, а ненасыщенные (особо полиненасыщенные) и разветвленные жирные кислоты образуют рыхлые участки в мембранах. Гомогенный состав насыщенных жирных кислот в ганглиозидах, а также наличие одинаковой по длине, числу и месту двойных связей гидрофобной части молекул определяют, с одной стороны, плотную и прочную упаковку и стабилизацию мембраны в той ее области, где локализованы эти гликолипиды, а с другой — ее изменчивость, эластичность и проницаемость в этом участке благодаря возможному вращению жирнокислотных остатков. Можно полагать, что изменение по-

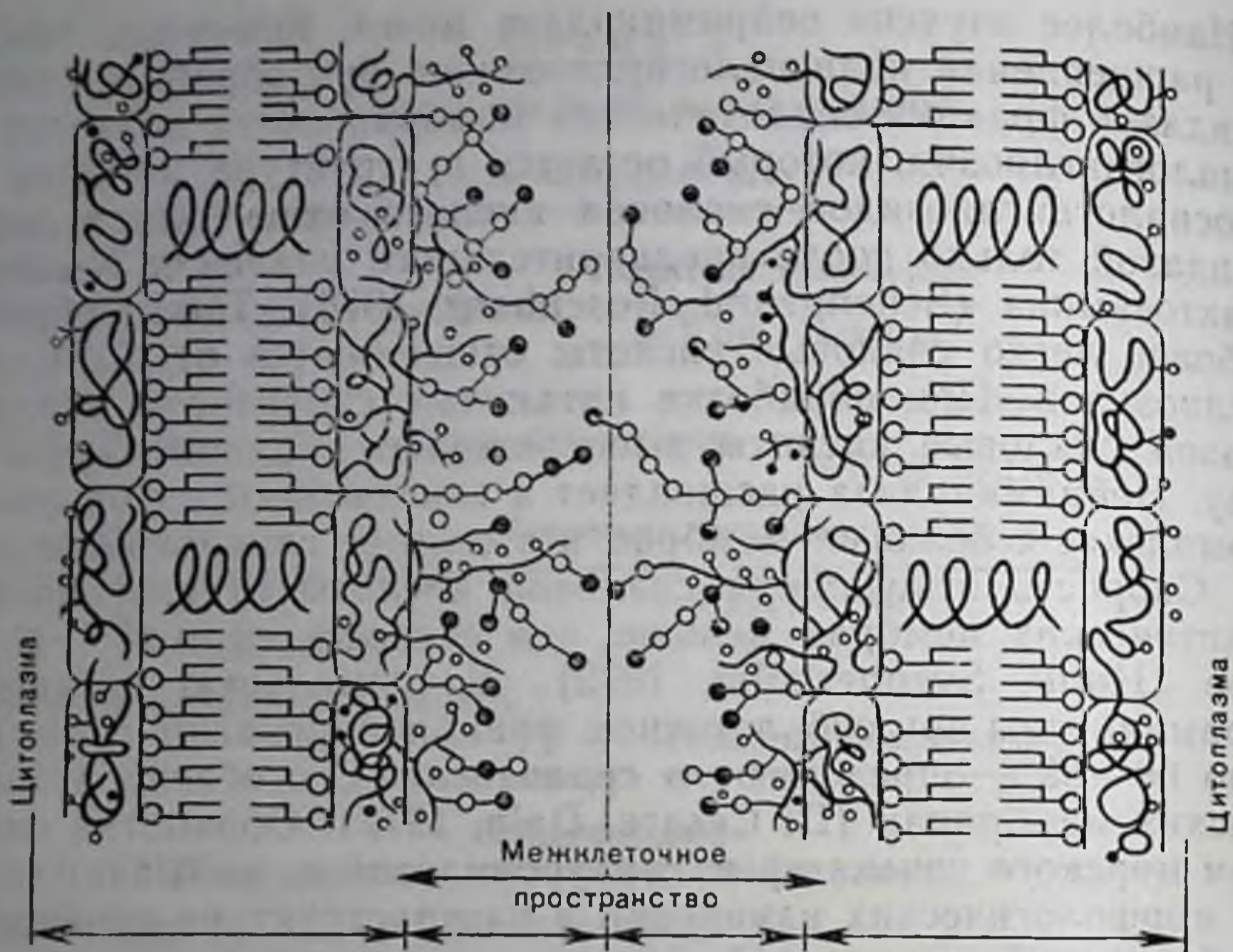


Рис. 11. Локализация ганглиозидов в синаптических мембранах (по Pfeiffer, 1972, с изменениями).

ложение этих структур индуцирует изменение конформации гидрофобно связанных с ними белков. Таким образом, ферментативная активность синаптических мембран определяется структурированностью как гидрофильной, так и гидрофобной частей молекулы ганглиозидов.

Разветвленная олигосахаридная часть ганглиозидов находится на внешней стороне и ориентирована в синаптическую щель, где углеводные компоненты, особенно сиаловые кислоты, как «антенны», по образному выражению Leninger (1968), тянутся к соседней пост-СМ (рис. 11). Таким образом, мозаика поверхности, «опушенности» синаптических мембран определяется первичной структурой ганглиозидов и гликопротеидов, третичной структурой ганглиозидов и степенью их полимеризации, а также степенью дискретности, т. е. интервалами, занимаемыми гликолипидами и гликопротеидами.

Поливалентные анионные группы ганглиозидов, особенно карбоксильные группы N-ацетилнейраминовой (сиаловой) кислоты, создают на поверхности синаптических мембран фиксированные отрицательные заряды. Анионные группы ганглиозидов важны для катионообменных реакций мембраны и для стабилизации ее  $Ca^{++}$ . Большую роль в этих процессах играет динамическое равновесие тетра  $\rightleftharpoons$  три  $\rightleftharpoons$  ди  $\rightleftharpoons$  моно (сиалоганглиозидов). Ганглиозиды способны также связывать и одновалентные катионы. Проводимость лецитиновых двухслойных мембран для

нонов существенно возрастает при добавлении ганглиозидов (Clowes et al., 1972). Вытеснение  $Ca^{++}$ , связанного с ганглиозидами мембран  $Na^+$ , по мнению Huttenen (1969), может быть причиной структурных перестроек при деполяризации.

В пре-СМ ганглиозиды являются рецепторами некоторых бактериальных белков токсинов (столбнячного и ботулинического), нарушающих секрецию медиаторов. В пост-СМ ганглиозиды могут входить в состав некоторых рецепторов медиаторов, например серотонина (см. главу 12). При ганглиозидозах (накопление определенных ганглиозидов при различных формах патологии) мембрана лишается рецепторных функций, способности к проведению возбуждения. Главной функцией ганглиозидов в ЦНС, по мнению некоторых исследователей (Roseman, 1970), является участие в иммунохимическом межклеточном взаимодействии между нейронами, а также между нейронами и нейроглией. Предполагается три типа химического механизма межклеточных контактов: 1) реакция антиген — антитело; 2) образование водородных связей между олигосахаридными цепочками ганглиозидов двух близлежащих мембран; 3) фермент-субстратное взаимодействие. Roseman считает наиболее вероятным третий вариант. Межклеточный контакт происходит при локальном и временном связывании между гликозилтрансферазой одной клетки и олигосахаридной цепочкой ганглиозидов другой. Напомним, что продукт каждой гликозилтрансферазной реакции становится субстратом для следующей реакции наращивания углеводного компонента в молекуле ганглиозида. При определенных условиях (например, рост нервов, образование синапсов) фермент одного нейрона участвует в гликозилировании субстрата на другом нейроне при достаточном количестве углеводов в межклеточном пространстве. Далее происходит отделение фермента от продукта реакции и контактные свойства утрачиваются. Вновь образованной молекуле ганглиозида потребуется свой фермент для дальнейшего ресинтеза или закрепления контакта с другой поверхностью. Данный процесс регулируется аллостерическими и конформационными изменениями ферментов, а также содержанием углеводов компонентов, УДФ, ГДФ, ЦМФ и  $Ca^{++}$ . Известно, что  $Ca^{++}$  подавляют гликозилтрансферазу (Sveppengholm, 1970). Можно полагать, что в состоянии покоя, когда  $Ca^{++}$  связаны ганглиозидами мембран, гликозилирование минимально, а при деполяризации — максимально.

По мнению Vogoch (1970), ганглиозиды способны участвовать в хранении и передаче информации, поскольку они соответствуют требованиям, предъявляемым кодирующим (информационным) молекулам: 1) высокая степень гетерогенности структуры ганглиозидов (за счет трехмерной организации); 2) локализация в мембранах и функция межклеточного «узнавания»; 3) совпадение накопления кодирующих веществ в ткани с вы-

работкой поведенческих реакций организма — в первые 3 недели постнатального развития отмечается резкое увеличение количества ганглиозидов во фракции синаптических мембран (Geisen et al., 1972) и их обновления в синаптосомах (Maccioni, Carutto, 1968); 4) высокий уровень обмена; 5) изменение концентрации и структуры ганглиозидов ухудшает память (например, при ганглиозидозных идиотиях); 6) изменение содержания индивидуальных ганглиозидов в синаптосомах мозга крыс при обучении и выработке условного рефлекса (Irvin, Samson, 1971), снижение скорости обмена ганглиозидов ( $G_{мз}$ ) в синаптосомах мозга крыс при сочетанной стимуляции их звуком и светом (Maccioni et al., 1971).

По данным McIlwain и соавт. (1961), связывание сиаловой кислоты ганглиозидов основными белками (протамины, гистоны) приводит к нарушению активного транспорта  $K^+$  и как следствие — к потере срезами мозга способности отвечать на стимуляцию электрическим током снижением содержания макроэргических соединений в ткани. Последующее добавление ганглиозидов восстанавливает способность срезов активно поглощать  $K^+$ . Срезы мозга, предварительно обработанные основными белками, теряют способность к деполяризации.

Как отмечалось, в СП нет ганглиозидов и лишь в небольших количествах присутствуют гликопротеиды, частично сиалогликопротеиды (вариабельность объясняется типом медиаторов в пузырьках). В хромаффинных гранулах надпочечников олигосахаридные цепи гликопротеидов обращены внутрь гранулы, что важно для связывания катехоламинов и дофамин- $\beta$ -гидроксилазы.

## ФОСФОЛИПИДЫ

Фосфолипиды являются основными липидами мембран. Для синапсом мозга различных животных, особенно позвоночных, характерно большое сходство набора фосфолипидов, в частности липидов целого мозга (Е. М. Крепс, 1967). Сходство липидного состава (фосфолипиды и холестерин) отмечается для фракций синаптических мембран, синапсом и микросом мозга.

Наряду с общими чертами липидного состава мембран синаптических структур можно отметить некоторые специфические черты. Каждый вид мембран имеет свой «липидный паспорт», характеризующийся молярным отношением трех основных типов липидов (фосфолипиды/холестерин/гликолипиды), отношением белок/липид и вариабельностью состава жирных кислот. Например, весовое отношение белок/липид для фракций мозга крыс следующее: миелин — 0,95, микросомы — 0,94, синаптические мембраны — 1,27 (Seminaro et al., 1964) или: синапсомы мозга крыс — 1,66, митохондрии — 3,0, миелин — 0,8 (Lapetina

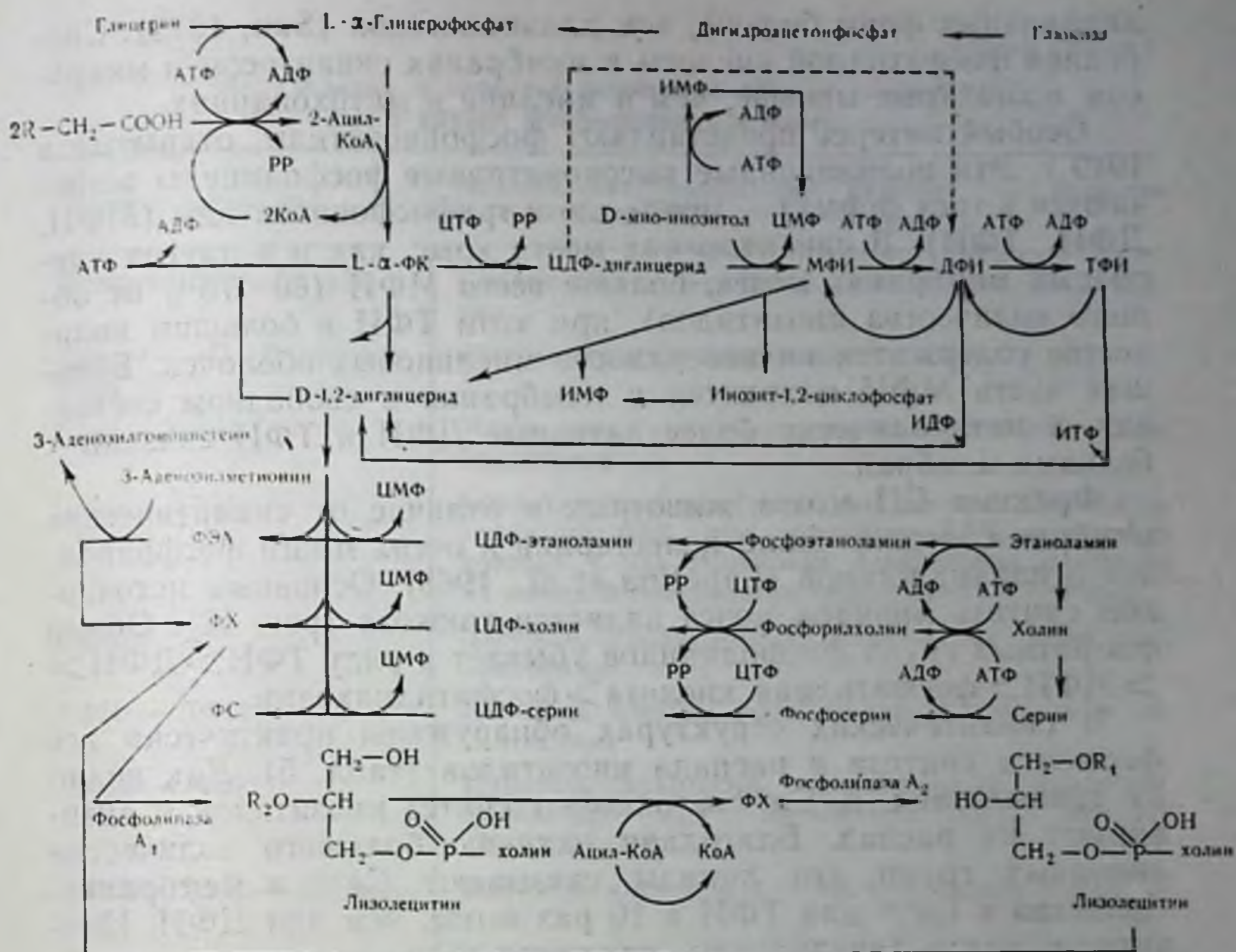


Рис. 12. Обмен фосфолипидов.

ФК — фосфатидная кислота; ФХ — фосфатидилхолин; ФС — фосфатидилсерин; ФЭА — фосфатидилэтаноламин.

et al., 1968). Для очищенной фракции СП мозга животных характерно низкое отношение белок/липид — 0,33 (Whittaker, 1969) или 0,7 (Breskenbridge et al., 1973). Для синапсом (синаптические мембраны) мозга животных содержание фосфолипидов следующее (за 100% принято содержание суммарных фосфолипидов): фосфатидилхолин — 40—50%, фосфатидилэтаноламин — 20—33%, фосфатидилсерин — 13—18%, сфингомиелин — 2—6%, монофосфонозитид — 3,6—5,2%, фосфатидная кислота — 0,4—1,3%, кардиолипид — 0,6—1,9%. Кардиолипид локализован в митохондриях (в том числе и в синаптических), где он синтезируется. Считается, что наружная сторона клеточной мембраны содержит преимущественно неполярные, а внутренняя — полярные фосфолипиды. Фракция синаптических мембран мозга животных содержит меньше сфингомиелина, чем миелина и микросом, и следовые количества лизолецитина (Breskenbridge et al., 1973), а также мало плазмалогенов. В синапсом мозга человека в составе фосфолипидов плазмалогенов больше, чем диацильных форм, в то время как в миелине, наоборот,

диацильных форм больше, чем плазмалогенов (Sun, 1973). Свободной фосфатидной кислоты в мембранах синапсом и микросомом мозга крыс меньше, чем в миелине и митохондриях.

Особый интерес представляют фосфоинозитиды, открытые в 1949 г. Эти полианионные высокоактивные фосфолипиды встречаются в трех формах — моно-, ди- и трифосфоинозитиды (МФИ, ДФИ, ТФИ). В синапсомах мозга крыс, как и в других клеточных мембранах мозга, больше всего МФИ (60—75% от общего количества инозитидов), при этом ТФИ в большом количестве содержатся на поверхности миелиновых оболочек. Большая часть МФИ находится в мембранах в свободном состоянии, а метаболически более активные ДФИ и ТФИ связаны с белками мембран.

Фракция СП мозга животных в отличие от синаптических мембран содержит мало холестерина и очень много фосфолипидов и плазмалогенов (Lapetina et al., 1968). Основным источником синтеза липидов мозга является глюкоза (рис. 12). Обмен фосфатных групп фосфолипидов убывает в ряду ТФИ > ДФИ > МФИ > фосфатидная кислота > фосфатидилхолин.

В синаптических структурах обнаружены практически все ферменты синтеза и распада инозитидов (табл. 5). Как видно из данных табл. 5,  $Ca^{++}$  блокируют синтез инозитидов и активируют их распад. Благодаря наличию большого количества анионных групп эти липиды связывают  $Ca^{++}$  в мембранах. Сродство к  $Ca^{++}$  для ТФИ в 10 раз выше, чем для ДФИ. Инозитиды, как и ганглиозиды, являются регуляторами динамического равновесия связанного и свободного  $Ca^{++}$  на поверхности нейрональных мембран, сдвигающегося в сторону высвобождения мембранно-связанного  $Ca^{++}$  при деполяризации нейронов (Salway, Hughes, 1972).

Таким образом, инозитиды выполняют важную функцию в механизме возбуждения. В связи с этим можно предполагать, что в состоянии покоя наиболее активными должны быть процессы синтеза ДФИ и ТФИ и сорбции  $Ca^{++}$  в пре-СМ, а при возбуждении нервных окончаний — процессы распада полиинозитидов и десорбции  $Ca^{++}$ . На основании этого можно объяснить также и возможное участие этих липидов в механизме активного транспорта катионов. Предполагается (Nakamura, Konishi, 1974), что активное поглощение  $Ca^{++}$  микросомами мозга в присутствии  $Mg^{++}$  и АТФ может происходить за счет превращения ДФИ в ТФИ.

Использование различных меченых предшественников позволило установить, что при кратковременной экспозиции синтез фосфолипидов происходит в теле нейрона и в меньшей степени в синапсомах, и только после длительной экспозиции наблюдается увеличение радиоактивности фосфолипидов в синапсомах. Интенсивность обмена фосфатидилхолина в значительной мере зависит от природы мембран. Например, значение  $t_{50}$  для



Локализация и свойства ферментов обмена инозитидов  
и других фосфолипидов в мозге

Реакция, ферменты	Максимальная локализация фермента во фракциях и свойства ферментов
Фосфатидатфосфатаза	Синаптические мембраны, микросомы, митохондрии
Синтез ЦДФ-диглицерида	Митохондрии > синаптосомы
Синтез МФИ	Микросомы, синаптические мембраны > цитозоль синаптосом
Синтез ДФИ	Синаптические мембраны, микросомы. Солюбилизация на 60% при обработке 0,1% раствором тритона X-100. Возможна локализация фермента на внешней поверхности синаптических мембран
Синтез ТФИ	Цитозоль синаптосом > синаптические мембраны, микросомы
ТФИ → ДФИ	Цитозоль клеток, очень малая активность в синаптосомах
ДФИ → МФИ	Цитозоль синаптосом > синаптические мембраны. Активатор — $Mg^{++}$ ; ингибиторы: ЭДТА, $Na^+$ , $K^+$ (20—100 мМ)
ДФИ, ТФИ → диглицерид	Цитозоль клеток, в том числе в синаптосомах
МФИ → диглицерид	Синаптические мембраны, микросомы и цитозоль синаптосом. Активатор — $Ca^{++}$
Синтез инозитидов	Активаторы: $Mg^{++}$ , $Mn^{++}$ ; ингибиторы: $Ca^{++}$ , $Cu^{++}$
Диглицеридкиназа	Цитозоль синаптосом, синаптические мембраны. Ингибитор — $Ca^{++}$ (для цитозольной формы)
Холинкиназа	Цитозоль синаптосом. Активатор — $Mg^{++}$ ; ингибитор — гемихолин-3

Примечание. Таблица составлена по материалам Harwood, Hawthorne (1969), Cotman и соавт. (1971), Ansell, Spanner (1974).

фосфатидилхолина синаптических мембран больше, чем для микросом мозга. Различные части молекулы этого липида обмениваются с разной скоростью, наиболее эффективно — при использовании  $^{14}C$ -глицерина, менее —  $^{14}C$ -холина и слабо —  $^{32}P_{II}$ . При помощи  $^{14}C$ ( $CH_3$ )-холина были рассчитаны значения  $t_{50}$  для фосфатидилхолина различных фракций ткани мозга (внутрижелудочковое введение крысам): синаптосомы — 52, миелин — 167, синаптические митохондрии — 27, синаптические мембраны — 35—61, СП — 30 дней (Lapetina et al., 1970). В случае внутрочерепного введения этого же предшественника крысам получены доказательства наличия двух фондов фосфа-

тидилхолина в синапсосомах ( $t_{50}$  составляет 2 и 52 дня), при этом высокообменивающийся липид связан с медленным компонентом аксотока, а низкообменивающийся — с его быстрым компонентом (Pasquini et al., 1973). Спустя 4 ч после введения  $^{32}\text{P}_{11}$  в спинномозговую жидкость крысам синтез МФИ был наиболее активным в цитозоле, ДФИ — в микросомах, синапсосомах и митохондриях, ТФИ — в миелине и менее активным в синапсосомах и микросомах мозга (Kai, Hawthorne, 1966).

После инкубации синапсосом мозга крысят в среде Кребса — Рингера в присутствии  $^{32}\text{P}_{11}$  90% радиоактивности обнаруживается в фосфатидной кислоте и инозитадах, и лишь небольшая часть — в лецитине. Обмен липидов блокировали ДНФ, азид Na, тиоловые яды, олигомицин и  $\text{Ca}^{++}$  в больших концентрациях и активировали  $\text{Mg}^{++}$ . Опыты выявили зависимость обмена липидов в нервных окончаниях от биоэнергетических процессов (Abdel-Latif et al., 1973). Обновление *in vitro* характерно для синапсосом, но не для митохондрий мозга. После инкубации синапсосом с фосфатом наиболее значительно обновляются фосфолипиды фракции СП, чем синаптических мембран, причем обновление активируется  $\text{Ca}^{++}$ . Максимальная интенсивность обмена фосфолипидов СП наблюдается также в опытах с инкубацией синапсосом с меченым ЦДФ-холином и со смесью меченых жирных кислот и глюкозы.

Наиболее активно обновляются инозитады синапсосом коры мозга крыс при их инкубации с  $1\text{-}^{14}\text{C}$ -глицерином (Lunt, Lapertina, 1970). В этой же работе изучена интенсивность обмена лецитина при использовании холина. Предполагают, что в опытах происходил не синтез *de novo*, а обмен различных частей молекул фосфолипидов. При использовании меченого  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}_{11}$ -АТФ установлено, что в синапсосомах коры мозга морской свинки наиболее интенсивно обменивается МФИ (Schacht, Agranoff, 1974).

Показано, что 95% меченого холина при инкубации с синапсосомами мозга крысят связывается с лецитином и 4,5% — с лизолецитином. Ионы кальция (1—3 мМ) в большей степени, чем  $\text{Mg}^{++}$ , активируют включение, однако высокие концентрации  $\text{Ca}^{++}$  (5—20 мМ) полностью тормозят обновление лецитина. Оптимальным для действия  $\text{Ca}^{++}$  является рН 9,0—9,5, а для  $\text{Mg}^{++}$  — 7,5. В присутствии  $\text{Ca}^{++}$  ДНФ и субстраты цикла Кребса активируют обмен лецитина, хотя без  $\text{Ca}^{++}$  ДНФ, наоборот, тормозит его. Обновление лецитина резко ослабляется в синапсосомах, разрушенных в гипотонических растворах. В этой серии опытов ЦТФ не является кофактором включения (Abdel-Latif, Smith, 1972). Интактные и разрушенные синапсосомы и митохондрии не синтезируют лецитин из ЦДФ- $^{14}\text{C}$ -холина или фосфорил- $^{14}\text{C}$ -холина, включение холина не зависит от биоэнергетических процессов, хотя и активируется  $\text{Ca}^{++}$ . Miller и Dawson (1972) считают включение холина в лецитин синап-

тосом процессом замещения. Таким образом, на основании приведенных данных пока нельзя сделать заключения о возможности локального синтеза фосфолипидов в нервных окончаниях, хотя наличие ферментов обмена в терминалях предполагает такую возможность.

## ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

Содержание жирных кислот (ЖК) в ткани мозга очень велико (20—25% сухого остатка мозга). Широкая вариабельность состава ЖК в липидах мозга — отличительное свойство этой ткани. Насыщенные ЖК этерифицированы преимущественно в 1-м положении глицеридов, а ненасыщенные — во 2-м положении. Синтез ЖК происходит в основном в цитозоле нейронов и частично в митохондриях. Обновление ЖК *in vitro* в синапсосомах мозга крыс активируется АТФ, D-глюкозой и малонил-КоА, но не ацетил-КоА и НАДФ·Н (Коеррен et al., 1973). Учитывая, что ацетил-КоА в нервных окончаниях относительно мало, синтеза *de novo* в терминалях может не происходить и ЖК поступают в них с аксотоксом. Показано также, что обмен 80% ЖК происходит в синаптических митохондриях и 20% — в синаптических мембранах. Наибольшей интенсивностью обмена обладают ЖК фосфолипидов. В синапсосомах мозга крыс в отличие от других субклеточных фракций ЖК отличаются вариабельностью, особенно в составе фосфатидилхолина. Значение отношения триенов к тетраенам минимальное в синапсосомах и максимальное в миелине (Galli et al., 1972).

Фосфолипиды (за исключением фосфатидилхолина) синаптических мембран по сравнению с мембранами целого мозга, печени и эритроцитов отличаются высоким содержанием полиненасыщенных ЖК. Отмечаются элементы сходства и различия качественного и количественного состава ЖК во фракциях синаптических мембран, СП, микросом и миелина мозга животных. В фосфатидилхолине синаптических мембран и СП содержатся главным образом ЖК —  $C_{16:0}$ ,  $C_{18:1}$  и  $C_{18:0}$ . Недостаток в диете незаменимых ЖК значительно отражается на составе ЖК фосфолипидов синаптических мембран. При этом изменение состава полиненасыщенных ЖК в составе фосфатидилэтанолами на синаптических мембран мозга мышей коррелирует с изменением активности Na,K-АТФ-азы (A. Sun, G. Sun, 1974).

В нервной ткани локализованы фосфолипазы, преимущественно типа  $A_1$  и  $A_2$ , отщепляющие ЖК соответственно в 1-м и 2-м положениях глицеридов. Фосфолипаза  $A_1$  с оптимумом рН 6,4—6,8 обнаруживается преимущественно во фракции микросом и синаптических мембран мозга крыс (Woelk et al., 1974). Более активная, чем фосфолипаза  $A_1$ , фосфолипаза  $A_2$  локализована в синаптических митохондриях (оптимум рН 8,4) и СП

(оптимум рН 4,8). По мнению авторов, нервные окончания являются местом как биосинтеза, так и разрушения фосфолипидов. Другие авторы (Gullis, Rowe, 1973) обнаружили фосфолипазу  $A_2$  во фракции синаптических мембран мозга морской свинки, хотя активность ее там оказалась меньше, чем в СП. В свою очередь фосфолипаза  $A_2$  в синаптических мембранах имеет два оптимума рН — 3,5 (более активная форма фермента) и 6,5.

При инкубации срезов коры мозга крыс с фосфолипазой А отмечается высокая резистентность активной зоны синапсов, размеры синаптической щели не изменяются, однако уменьшается количество СП около активной зоны. Разрыхление пре- и пост-СМ наблюдается лишь при высокой концентрации фермента (Cedergren et al., 1973).

Рассмотрим две гипотезы о роли фосфолипидов в механизмах секреции медиаторов и деполяризации мембран. Суть первой состоит в следующем: возбуждение пре-СМ вызывает активацию фосфолипазы А в мембранах СП, возможно, при помощи  $Ca^{++}$ , накопившихся в терминалях при деполяризации, или при помощи цАМФ-чувствительной протеинкиназы. Далее следует деацилирование фосфолипазой фосфодиглицеридов (в основном лецитина) и образование лизолецитина, детергентоподобное действие которого вызывает нарушение нативности мембран СП и последующую секрецию медиаторов. Лизоформы липидов затем реагируют до исходного состояния мембран СП. Уязвимые места в принципе можно найти в любой гипотезе. В рассматриваемой гипотезе, например, допускается, что СП, находящиеся в контакте с пре-СМ, более доступны действию фосфолипазы, чем свободные СП в цитоплазме терминалей. Эта гипотеза основана на данных о высоком содержании лизолецитина (до 17% от количества всех фосфолипидов) в хромаффинных гранулах надпочечников (Blaschko et al., 1967). Она базируется на фактах обнаружения в СП фосфолипазы  $A_2$  и увеличения высвобождения катехоламинов (до 90% их запаса) из хромаффинных гранул при их обработке фосфолипазой  $A_2$  или смесью лизолецитина и жирных кислот (Taugner, Wähler, 1974). Фосфолипаза  $A_2$  разрушает изолированные СП из электрического органа ската или коры мозга животных, что коррелирует с высвобождением ацетилхолина из СП (Heilbronn, Nilsson, 1971).

Теперь приведем факты, свидетельствующие о том, что эта гипотеза неверна. Во-первых, во фракции СП мозга животных и электрического органа ската, селезеночного нерва содержание лизолецитина очень низкое и не превышает 1—5% от количества лецитина в гранулах. Во-вторых, при деполяризующем действии ацетилхолина на срезы надпочечников не отмечено изменений в обмене лизолецитина (Trifago, 1969). Показано, что калиевая деполяризация (50 мМ КСl) синапсом коры

мозга морских свинок или стимуляция электрическим током электрического органа ската не вызывает изменений в содержании лизолецитина и других фосфолипидов (включая инозитиды) во фракции СП и скорости обмена ЖК во фракции СП при калиевой деполяризации синапсом в присутствии меченых предшественников. В обоих вариантах деполяризации во фракции СП отмечено уменьшение запасов ацетилхолина (Vaker et al., 1975).

Согласно второй гипотезе, деполяризация синаптических мембран сопровождается деацилированием ЖК фосфолипидов, например лецитина. Здесь интересны три момента. Во-первых, деполяризация синаптических мембран должна сопровождаться активацией  $\text{Ca}^{++}$ -зависимой фосфолипазы. Во-вторых, структурные изменения в мембранах в ходе деполяризации вследствие деятельности фосфолипазы могут приводить к появлению специфических для ионов каналов. В-третьих, высвободившиеся под действием фосфолипазы ЖК могут модулировать секреторный процесс в терминалях как разобщители окислительного фосфорилирования (см. главу 7). Известно, что  $\text{Ca}^{++}$ -активируемая фосфолипаза клеточных мембран из неактивной формы превращается в активную при помощи цАМФ-чувствительной протеинкиназы. Это убедительно показано в отношении фосфолипазы  $A_2$ , локализованной во фракции синаптических мембран мозга морской свинки (Gullis, Rowe, 1975). Авторы высказывают предположение, что изменения системы деацилирования—ацилирования связаны с нарушениями проницаемости синаптических мембран для катионов. Эти же авторы показали, что медиаторы (например, ацетилхолин, норадреналин, ГАМК и др.) в низких концентрациях ( $10^{-5}$ — $10^{-6}$  М) и в содержащей  $\text{Ca}^{++}$  среде аллостерически стимулируют фосфолипазу  $A_2$  и  $\alpha$ -глицерофосфатацилтрансферазу синаптических мембран.

#### УЧАСТИЕ ИНОЗИТИДОВ И ДРУГИХ ЛИПИДОВ В МЕХАНИЗМАХ ДЕ- И ГИПЕРПОЛЯРИЗАЦИИ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

С 1950 г. делались попытки обнаружить характерные изменения в обмене фосфолипидов при возбуждении нервной системы. Однако только после тщательного изучения обмена инозитидов, цикла фосфатидной кислоты и обмена отдельных, а не суммарных фосфолипидов супругами Нокін (1960, 1964) было установлено, что ацетилхолин ( $10^{-2}$ — $10^{-5}$  М) в присутствии эзерина и меченого предшественника ортофосфата ( $^{32}\text{P}_{II}$ ) вызывает увеличение распада инозитидов и затем их компенсаторный синтез (увеличение интенсивности обмена МФИ и фосфатидной кислоты) в ткани мозгового слоя надпочечников, поджелудочной железы и симпатических ганглиев и других холинореактив-

ных структур животных. При инкубации срезов мозга животных с  $^{32}\text{P}$ -ацетилхолин или карбамилхолин стимулирует обмен МФИ больше, чем фосфатидной кислоты. Данный эффект умеренно тормозится  $\text{Ca}^{++}$ , полностью — атропином, проявляется также в присутствии  $^3\text{H}$ -инозита и немеченых глицерина и ЖК, выявляется во фракциях микросом и неочищенных синапсом. Позднее радиоавтографическим методом было показано (М. Нокін, 1965, 1966), что ацетилхолин стимулирует интенсивность обмена МФИ лишь в постсинаптических структурах верхнего шейного ганглия кошек, при этом дегенерация преганглионарных нервов не устраняет указанного выше эффекта. Интересно, что перерезка моторных нервов вызывает стимуляцию обмена МФИ, коррелирующую с увеличением количества холинорецепторов в мышцах (Appel et al., 1974). Другой медиатор — норадреналин в срезах подчелюстной и околоушной желез стимулирует интенсивность обмена МФИ и фосфатидной кислоты. Такой же эффект воспроизведен на срезах различных отделов головного мозга морских свинок, однако интенсивность обмена неполярных фосфолипидов была слабее, чем в норме (М. Нокін, 1969).

Вначале пытались объяснить эти данные участием фосфолипидов в транспорте ионов. Во-первых, предполагалось, что ацетилхолин является структурным аналогом фосфатидилхолина в синаптических мембранах. Замещение лецитина ацетилхолином может, согласно М. Нокін, приводить к определенным конформационным перестройкам в мембране, в результате чего изменяется ее проницаемость. Активный транспорт  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  может осуществляться с участием обратимых, циклически протекающих реакций фосфорилирования и дефосфорилирования инозитидов и фосфатидной кислоты. Однако предположение о том, что фосфатидная кислота является переносчиком  $\text{Na}^+$  в системе Na-насоса, сейчас оспаривается. Авторы полагали, что на внутренней поверхности возбудимой мембраны осуществляется реакция фосфорилирования и возникающий кислый фосфатидинозитид связывается с  $\text{Na}^+$ . Фосфатидат натрия диффундирует через мембрану, и на наружной ее поверхности освобождается  $\text{Na}^+$  при гидролизе фосфатидной кислоты.

После открытия М. Нокін, Л. Нокін эффект увеличения интенсивности обмена цикла фосфатидной кислоты в мембранах при действии медиаторов был воспроизведен и уточнен на различных объектах.

Увеличение интенсивности обмена МФИ при действии ацетилхолина на гладкие мышцы морских свинок или на верхний шейный ганглий крыс связано с функционированием М-холинорецепторов. Действие 0,01 мМ ацетилхолина и преганглионарная стимуляция электрическим током (5—10 Гц, 3—5 ч) верхнего шейного ганглия крыс оказывают одинаковое действие—

активируют включение  $^{32}\text{P}_{\text{II}}$  в МФИ, но не в фосфатидную кислоту (Lagabee, 1968). Этот эффект снимается тубокурарином. Стимуляция электрическим током нервного волокна в той области, где нет синаптических контактов, не приводит к подобной реакции. В бескальциевой среде преганглионарная стимуляция не изменяет интенсивности обмена МФИ, но снижает скорость обмена фосфатидной кислоты и других фосфолипидов.

При инкубации гомогената мозга морской свинки ацетилхолин (0,1 мМ) стимулирует включение  $^3\text{H}$ -инозита в фосфатидную кислоту. Максимальный эффект проявляется в синаптосомах, в меньшей степени в микросомах и не зависит от новообразования АТФ в ткани. Стимуляция обмена фосфатидной кислоты проявляется и при инкубации ацетилхолина с целостными, но не с разрушенными в гипотонической среде синаптосомами (Durell, Garland, 1969). Такие же результаты получены при использовании меченого  $^{32}\text{P}_{\text{II}}$ . В частности, показано (Abdel-Latif et al., 1974), что стимуляция ацетилхолином (0,1 мМ) интенсивности обмена инозитидов и фосфатидной кислоты в срезах ткани мозга крыс характерна в большей степени для нейронов, чем для нейроглии (максимальна в синаптосомах). Наиболее интенсивная стимуляция обмена наблюдалась при использовании синапсом, выделенных из мозга молодых крыс. В опытах *in vivo* (карбамилхолин) и *in vitro* (0,1—1,0 мМ ацетил- или карбамилхолин) показано, что в присутствии  $^{32}\text{P}_{\text{II}}$  стимуляция М-холинорецепторов в срезах ткани или синаптосомах коры мозга морских свинок приводит к усилению более чем на 50% интенсивности обмена МФИ и фосфатидной кислоты и умеренному снижению скорости обмена ДФИ и ТФИ (Schacht et al., 1974). Анализ полученных результатов позволил авторам высказать гипотезу, что ацетилхолин стимулирует непосредственно гидролиз фосфатидной кислоты. Однако эта гипотеза не признается рядом исследователей. Высказываются и другие точки зрения, в частности о том, что ацетилхолин, взаимодействуя с мембранами эффекторных клеток, стимулирует синтез фосфатидной кислоты из АТФ и диглицерида (Hokin, Brown, 1969) либо фосфатидатфосфатазу (Abdel-Latif et al., 1974).

В опытах на разных тканях крыс (мозг, околоушная железа, семявыносящие протоки) показано, что стимуляция норадреналином или миметиками  $\alpha$ -адренорецепторов в присутствии  $^{32}\text{P}_{\text{II}}$  повышает интенсивность обмена МФИ и фосфатидной кислоты, адренолитики снимают действие норадреналина, а  $\beta$ -адреномиметики практически не оказывают эффекта. Нейроны спинного мозга кроликов быстро реагируют на вызываемое норадреналином усиление обмена инозитидов, а в глияльных клетках ответная реакция отмечается после латентного периода (Woelk et al., 1974). В тканях сердца крыс активация обмена фосфатидной кислоты при действии адреналина (0,1 мМ) или

изопротеренола (0,1 мМ) обратима, в то время как другой эффект — стимуляция обмена МФИ — необратим (Kiss, Farkes, 1975).  $\beta$ -Адренолитик анаприлин снижает интенсивность обмена фосфатидной кислоты в этих условиях.

Серотонин (10 мМ), норадреналин ( $10^{-2}$ — $10^{-5}$  М), дофамин (10 мМ), как и ацетилхолин (0,1 мМ), увеличивают интенсивность обмена инозитидов, фосфатидной кислоты и в незначительной степени лецитина в срезах коры мозга крысят при инкубации с меченым  $^{32}\text{P}_n$  (Abdel-Latif et al., 1974). В срезах мозга морских свинок серотонин (1 мМ) стимулирует обмен фосфатидной кислоты, а при большей концентрации (10 мМ) и обмен МФИ; ГАМК (1 мМ) уменьшает интенсивность обмена МФИ, ДФИ и фосфатидной кислоты; дофамин в низких концентрациях ( $10^{-5}$ — $10^{-6}$  М) угнетает обмен МФИ, лецитина и других фосфолипидов, а в высоких концентрациях (0,1 мМ) стимулирует обмен фосфатидной кислоты в подбугорной области; ацетилхолин (0,1—1,0 мМ) стимулирует обмен МФИ и фосфатидной кислоты. На основе этих данных М. Нокін (1970) предполагает, что возбуждающие и тормозящие медиаторы по-разному изменяют цикл фосфатидной кислоты в мембранах.

Таким образом, изменение обмена фосфатидной кислоты связано со взаимодействием ацетилхолина и холинорецептора. По данным Dugell (1967), это взаимодействие приводит к высвобождению ТФИ из его комплекса с рецептором и свободный инозитид подвергается превращению, в результате которого возникают ионофоры в хемочувствительной мембране. В лаборатории de Robertis показано, что активация обмена МФИ наблюдается при инкубации срезов мозга с ацетилхолином и меченым  $^{32}\text{P}_n$  или  $^{14}\text{C}$ -инозитом, но не ацетатом или глицерином. При фракционировании ткани после удаления общего липидного экстракта на сефадексе LH-20 холинорецептор выделялся вместе с МФИ (Lunt et al., 1971). Высказано предположение, что ацетилхолин на пост-СМ имеет две точки приложения: в первой осуществляется прямое и быстрое (в течение миллисекунд) взаимодействие с рецептором, приводящее к изменению конформации пост-СМ, а во второй происходит затем вторичное воздействие ацетилхолина на состояние МФИ, связанного с холинорецептором, которое вызывает модуляцию специфических синаптических путей, активирующихся при повторении импульсации.

Michell (1975) считает, что увеличение интенсивности обмена фосфоринозитной группы в инозитидах при действии медиаторов на рецепторы обусловлено расщеплением МФИ, ДФИ и ТФИ с последующим их компенсаторным ресинтезом. В ресинтезе полиинозитидов может принимать участие цАМФ-чувствительная протеинкиназа. Результатом таких обратимых и циклически протекающих процессов является изменение прони-



цаемости мембран для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и особенно для  $\text{Ca}^{++}$ . Mitchell отстаивает разобранную выше точку зрения, что распад полиинозитидов сопровождается высвобождением мембранно-связанных  $\text{Ca}^{++}$  и появлением ионселективных каналов. Он предполагает, что изменения в системе  $\text{МФИ} \rightleftharpoons \text{ДФИ} \rightleftharpoons \text{ТФИ}$  важны при восприятии, суммировании и усилении химической информации, поступающей к поверхности пост-СМ. Согласно гипотезе Togda (1974), обмен в системе  $\text{МФИ} - \text{ДФИ} - \text{ТФИ}$  может регулировать процессы де- и гиперполяризации пост-СМ. При изучении очищенных холинорецепторов электрического органа ската или мозга быка Togda доказала, что в структуру М-холинорецептора входит регуляторная субъединица ТФИ-фосфомоноэстеразы. Таким образом, взаимодействие ацетилхолина с М-холинорецептором приводит к образованию комплекса медиатора с регуляторной субъединицей фермента, в результате чего снижается степень угнетения каталитической субъединицы ТФИ-фосфомоноэстеразы, которая гидролизует ТФИ до ДФИ. Следствием этого процесса является деполяризация пост-СМ.

Гиперполяризация пост-СМ, согласно гипотезе Togda, протекает следующим образом. Образование комплекса медиатор—рецептор активирует АДЦ-азу. Синтезированный цАМФ связывается с регуляторной субъединицей ДФИ-киназы, вследствие чего прекращается ингибирование этого фермента. После этого облегчается процесс перехода ДФИ в ТФИ, который сопровождается характерными для гиперполяризации ионными сдвигами в пост-СМ.

Важное значение для понимания структурных перестроек в электровозбудимых мембранах при деполяризации имеют данные об изменении интенсивности обмена фосфолипидов и прежде всего инозитидов. По данным А. Г. Третьяка и соавт. (1975, 1976), стимуляция электрическим током нерва лягушки или нервных волокон краба в присутствии  $^{32}\text{P}_{ii}$  повышает интенсивность обмена ТФИ. Эффект коррелирует со временем стимуляции, проявляется с большей силой в демиелинизированных, чем в миелинизированных, нервах, потенцируется цАМФ. Ацетилхолин (20 мМ) наряду с торможением проведения нервного импульса вызывает снижение содержания ТФИ и увеличение МФИ в ткани нервных волокон краба.

Инкубация срезов мозга или синапсом коры мозга морских свинок с ацетилхолином (0,1 мМ) в присутствии  $^{32}\text{P}_{ii}$  вызывает в первом случае увеличение интенсивности обмена МФИ, а также частично ДФИ и ТФИ, во втором — фосфатидной кислоты. В обоих случаях эффект выражен в большей степени в СП, чем в синаптических мембранах. При стимуляции электрическим током (10 мин, 100 Гц) или калиевой деполяризации синапсом наблюдается  $\text{Ca}$ -зависимое увеличение включения  $^{32}\text{P}_{ii}$  в фосфатидную кислоту СП (Hawthorne, Bleasdale, 1975).

White и соавт. (1974) исследовали обмен инозитидов в различных периферических нервах крыс. Стимуляция электрическим током блуждающего нерва вызывала активацию обмена  $^{32}\text{P}_\text{H}$  и ДФИ, ТФИ. Этот эффект не связан с увеличением обмена на фоне лабильных нуклеотидов. При длительном раздражении электрическим током (3 ч) отмечали угнетение обмена ТФИ. Тетродотоксин (190 нМ) не влиял на эффект кратковременной стимуляции в блуждающем и френико-диафрагмальном нервах, но увеличивал интенсивность обмена неполярных фосфолипидов. Убаин (1 мМ) также не изменял эффекта стимуляции электрическим током в блуждающем нерве, но стимулировал обмен фосфолипидов. На фоне вызванной стимуляции френико-диафрагмального нерва убаин активирует обмен различных инозитидов и других фосфолипидов. При использовании в качестве предшественника  $^{32}\text{P}_\text{H}$  убаин угнетает обмен инозитидов, лецитина и фосфатидилэтаноламина в тканях предсердия кролика (Vegnick et al., 1973). Убаин, снижение температуры или  $[\text{Na}^+]_0$  уменьшали интенсивность обмена полиинозитидов в микросомах мозга крыс (Standeter, Samson, 1967).

Введение убаина и  $^{14}\text{C}$ -ацетата в мозг крыс угнетает обмен фосфатидной кислоты, лецитина и фосфатидилсерина (В. Л. Зубер, 1975) и стимулирует обмен цереброзидов и сульфатидов (Л. С. Чаева, 1975).

Можно предположить, что обмен фосфолипидов в химически и электровозбудимых мембранах имеет свою специфику.

В заключение следует отметить, что обмен фосфолипидов определенным образом зависит от функционирования нервной системы. При возбуждении ЦНС (фенамин, раздражение кожи электрическим током), как правило, обмен всех фосфолипидов мозга активируется, а при торможении ЦНС (наркоз, гипоксия) — угнетается (Д. А. Четвериков, 1974). Это позволило предположить существование изменений в липидном обмене при функционировании ЦНС «единым ансамблем» всех фосфолипидов.

## 6. Пассивный и активный транспорт ионов

---

### МЕМБРАННАЯ ТЕОРИЯ ВОЗБУЖДЕНИЯ

Эта теория, разработанная в 1950—1960 гг. Hodgkin, Huxley и Katz, вскрывает суть процессов в возбудимых нейрональных мембранах (структурные перестройки, ионселективные каналы, изменения мембранной проницаемости) при проведении нервного импульса (П. Г. Костюк, 1971; Б. И. Ходоров, 1975; Katz, 1968).

Мембранная проницаемость в состоянии покоя. В любых клетках, в том числе и нервных,  $K^+$  накапливаются внутри клеток ( $K^+ > Na^+$ ), а  $Na^+$  — во внеклеточной среде. Гомеостаз поддерживается балансом пассивного транспорта катионов (выход  $K^+$  из клетки и вход  $Na^+$ ) по градиенту концентрации и активного транспорта катионов против их градиента концентрации. В аксоне кальмара концентрация  $Na^+$  равна 50,  $K^+$  — 400;  $Cl^-$  — 40—100 мМ, а внеклеточная концентрация  $Na^+$  — 460,  $K^+$  — 10,  $Cl^-$  — 540 мМ. Учитывая наличие вненейрональных пространств, отношение  $[K^+]_i : [Na^+]_i$  для нейронов должно быть выше, чем в ткани целого мозга. В мотонейронах спинного мозга кошек внутриклеточная концентрация  $Na^+$  составляет 15,  $K^+$  — 150,  $Cl^-$  — 9 мМ, а внеклеточная концентрация  $Na^+$  — 150,  $K^+$  — 5,5;  $Cl^-$  — 125 мМ (Eccles, 1966). Расчеты показали (П. Г. Костюк, 1972), что кон-

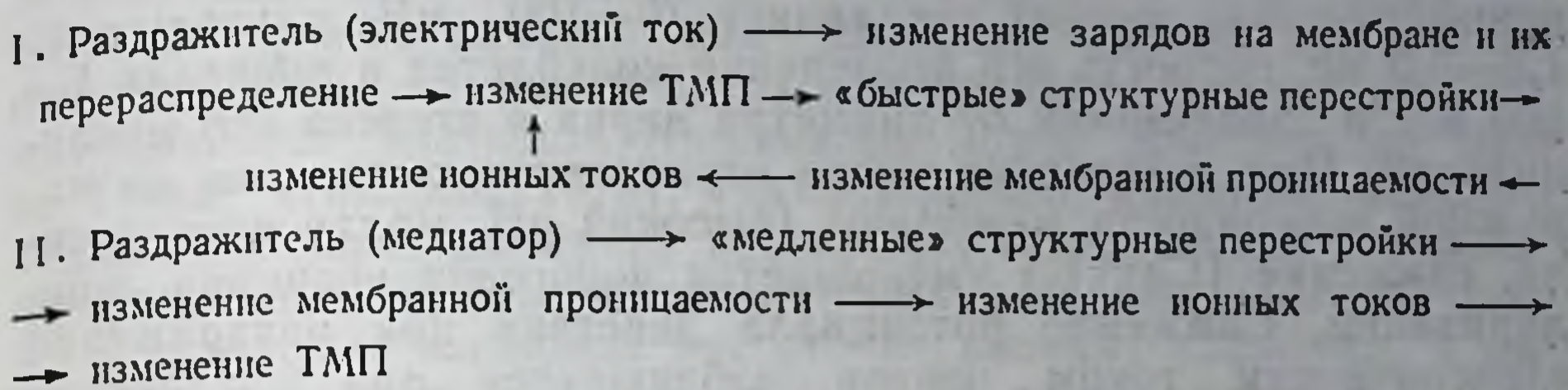
концентрация  $K^+$  в нейронах мозга высших животных составляет 90—110 мМ, в нейронах моллюсков — 77 мМ, а концентрация  $Na^+$  равна 45—60 и 20,4 мМ соответственно.

Главными внеклеточными ионами являются  $Na^+$  и  $Cl^-$ . Дефицит анионов внутри нервных клеток компенсируется кислотными аминокислотами и отрицательно заряженными группами белков и липидов. В нервных клетках в ионизированном состоянии находится большая часть  $K^+$  (около 90%) и 50%  $Na^+$ . Например, в синапсосомах мозга мышей при температуре 0—4 °С 95%  $K^+$  обменивается с внеклеточным  $^{42}K$  (Weinstein, Kurijama, 1970). В синапсосомах мозга отношение  $K^+/Na^+$  составляет 1,78, а  $Cl^-/Na^+$ —4,8 (Blaustein, Oborn, 1975). В состоянии покоя возбудимые мембраны в 75 раз более проницаемы для  $K^+$ , чем для  $Na^+$ . Из расчетов следует, что ТМП покоя с учетом потока ионов по градиенту концентрации и электрохимическому градиенту должен быть равен равновесному электроотрицательному потенциалу для  $K^+$ , т. е. —90 мВ. В покое внутренняя мембрана возбудимых клеток заряжена отрицательно относительно наружной, а ТМП покоя в различных нервных клетках колеблется в диапазоне от —40 до —90 мВ. Таким образом, потенциал покоя существенно отличается от равновесных потенциалов мембраны для  $Na^+$  (+60 мВ) и  $K^+$  и ближе всего к потенциалу равновесия для  $Cl^-$  (—70 мВ). Мембрана в состоянии покоя относительно малопроницаема для  $Na^+$ , поскольку потенциал равновесия электроположителен. В состоянии покоя постоянно текут равные по силе и противоположные по направлению токи, идущие изнутри наружу через  $K$ -канал мембраны и снаружи внутрь через  $Na$ -канал. Для упрощения расчетов принимают, что величина ТМП покоя практически определяется из отношения  $[K^+]_i : [K^+]_o$ , т. е. возбудимая мембрана в покое может быть идеальным калиевым электродом. Показано, что увеличение  $[K^+]_o$  значительно снижает ТМП, в то время как изменение  $[Na^+]_o$  практически не влияет на него. Снижение  $[K^+]_i$  также резко уменьшает ТМП. В настоящее время принято считать, что на величину ТМП влияют не только диффузионные потоки  $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{++}$  и аниона  $Cl^-$ , но и электрогенные потоки катионов с участием  $Na, K$ -насоса. Влияние последних на ТМП зависит от сопротивления мембран.

**Мембранная проницаемость при возбуждении.** В электровозбудимых мембранах (внесинаптические участки мембраны нейрона — начальные сегменты аксона и вся аксональная мембрана) возбуждение приводит к деполяризации, резкому снижению ТМП, сопротивлению мембраны и увеличению проницаемости для катионов, особенно  $Na^+$ , который по градиенту концентрации, усиленному градиентом электрического поля, переносится внутрь клетки (схема 3). Снижение ТМП приводит к генерации потенциала действия, определяемого в основном положительным равновесным потенциалом для  $Na^+$ , т. е. отноше-

### Схема 3

#### Изменения ТМП в электровозбудимых (I) и химически возбудимых (II) мембранах



нием  $[Na^+]_i : [Na^+]_o$ . Развитие потенциала действия во времени характеризуется двумя фазами: 1) первичное, очень быстро деполяризирующее поступление  $Na^+$  внутрь клетки; 2) инактивация натриевой проводимости и вторичный, реполяризирующий выход  $K^+$  из клетки. Выход  $K^+$  усиливается после перезарядки мембран и пика потенциала действия. Этот процесс продолжается до восстановления исходного потенциала покоя и закрытия  $Na$ -каналов.

Таким образом, при деполяризации усиливается пассивный транспорт катионов:  $Na^+$  входит в клетки,  $K^+$  выходит из них. На основании того, что генерация и распространение импульса сопровождаются резкими изменениями проницаемости мембраны, предполагают, что процесс имеет «взрывной» характер. В момент возникновения импульса в мембране открываются  $Na$ -каналы. После входа  $Na^+$  внутрь аксоплазма в этом месте приобретает положительный заряд, увеличение которого усиливает по принципу положительной обратной связи открытие  $Na$ -каналов и тем самым увеличивает поток  $Na^+$ . При возбуждении в аксон должно войти большое количество  $Na^+$ , чтобы уравновесить возрастающий противоток  $K^+$ . Повышение калиевой проводимости во второй фазе, по мнению Katz (1968), является процессом с отрицательной обратной связью, который постепенно сам себя останавливает. Он приводит к быстрому окончанию инверсии ТМП и восстановлению нормальной возбудимости аксона, так что спустя 1—2 мс аксон готов к проведению нового импульса. Пассивная утечка катионов из нервов равна 0,8% от максимального выхода  $K^+$  при деполяризации. Нередко в естественных условиях или при искусственном снижении ТМП (например, в мотонейронах) наблюдается третья фаза генерации потенциала действия — следовая гиперполяризация (за счет интенсивности выхода  $K^+$  из клетки и приближения ТМП к потенциалу равновесия  $K^+$ ) длительностью до 100 мс и амплитудой около 20 мВ, которая снимается при повышении  $[K^+]_o$ . Описанные фазы наблюдаются при использовании изотопов; избирательных для ионов микроэлектродов и блокаторов ионселективных каналов. При образовании потенциала действия че-

рез  $1 \text{ мкм}^2$  мембраны аксона проходят в среднем  $2 \cdot 10^4$  катионов. В то же время проницаемость мембраны для  $\text{Na}^+$  возрастает в 400—500 раз по сравнению с состоянием покоя, а для  $\text{K}^+$  — всего в 10—15 раз. Амплитуда потенциала действия в ЦНС и периферических нервах составляет 70—100 мВ, длительность 1,5—3,0 мс, скорость его проведения колеблется в пределах 1—100 м/с в зависимости от диаметра нерва и степени его миелинизации. При повышении числа отрицательных зарядов на наружной поверхности мембраны (высокий рН, малая ионная сила, снижение  $[\text{Ca}^{++}]_o$ ) уменьшается пороговая величина деполяризации. Снижение потенциала действия при раздражении электрическим током нервов наблюдается при увеличении  $[\text{Na}^+]_i$ , замене внутриклеточного  $\text{K}^+$  на  $\text{Na}^+$ , снижении  $[\text{Na}^+]_o$ . При повышении  $[\text{K}^+]_o$  до 20—60 мм величина ТМП снижается пропорционально  $\lg [\text{K}^+]_o$ , но аксон теряет способность генерировать потенциал действия, так как он в этих условиях постоянно деполяризован. Аналогичный эффект оказывают  $\text{Rb}^+$  и  $\text{NH}_4^+$ . Деполяризованные таким способом мембраны невозбудимы в том смысле, что они неспособны генерировать потенциал действия при раздражении током, направленным наружу. Однако они могут давать ответы при раздражении током, направленным внутрь клетки.

#### ГИПОТЕЗА О СУЩЕСТВОВАНИИ ИОНСЕЛЕКТИВНЫХ КАНАЛОВ ВОЗБУДИМЫХ МЕМБРАН

Согласно мембранной теории возбуждения, в мембранах существуют ионселективные каналы (поры) для  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Ca}^{++}$ , по которым катионы движутся пассивно по электрохимическому градиенту. Na- и K-каналы химически неоднородны и пространственно разобщены. Потoki  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через мембрану относительно независимы друг от друга. В покое большинство каналов находится в пассивном (закрытом) состоянии, при возбуждении — в открытом. Количество открытых каналов зависит от значения ТМП. Гиперполяризация мембран возвращает каналы в состояние покоя как из состояния активности, так и из состояния инактивации. Таким образом, предполагается, что возбудимые мембраны обладают сложной структурой, перестройка которой при возбуждении приводит к изменению проницаемости. Открытие каналов обусловлено своеобразной упаковкой гидрофобных белково-липидных глобул в возбудимых мембранах. Считается, что каналы имеют форму воронки с большим внешним диаметром.

Изменения проницаемости при возбуждении касаются менее 1% (0,02%) поверхности мембраны аксона. На площади  $1 \text{ мкм}^2$  блуждающего нерва кролика находится примерно 30—75 каналов (расстояние между двумя каналами 0,2 мкм), нерва

омара — 36, обонятельного нерва щуки — 3 Na-канала (расстояние — 0,6 мкм). Размер K-канала составляет 0,26—0,30 нм, а Na-канала — 0,4 нм, причем вход в Na-канал контролируется 5—6 белковыми субъединицами (Hille, 1970). В мембранах аксонов количество каналов, как правило, больше, чем в теле нейрона (Eaton et al., 1975). В немиелинизированных аксонах максимальная плотность Na-каналов может достигать до 1000 на 1 мкм<sup>2</sup> (Hodgkin, 1975). Таким образом, движение каждого вида ионов через мембрану происходит через особые контрольно-пропускные пункты, число которых невелико. Поэтому скорость диффузии катионов достаточно низкая; например, в аксонах кальмара полупериод обмена K<sup>+</sup> составляет 10 ч. При векторном проведении импульса потери тока постоянно компенсируются усилением импульса, потому что вдоль аксона как бы расставлены (достаточно экономно и упорядоченно) усилители — нонселективные каналы, которые при возбуждении кратковременно изменяют проницаемость мембран. Расчеты показывают, что, когда Na-канал открыт, Na<sup>+</sup> проходят через него с большой скоростью (10<sup>8</sup> с<sup>-1</sup>), лишь на порядок меньшей, чем скорость движения Na<sup>+</sup> в межклеточной среде. Эти данные указывают, что движение Na<sup>+</sup> по своему каналу не требует специальных переносчиков, которые были бы способны перенести лишь 10<sup>4</sup> Na<sup>+</sup> за 1 с. Учитывая, что K-каналов в нерве намного больше (около 1000 на 1 мкм<sup>2</sup>), чем Na-каналов, а проводимость K<sup>+</sup> по своему каналу ниже, чем Na<sup>+</sup>, предполагается, что K<sup>+</sup> могут транспортироваться через мембраны при помощи специального переносчика.

При возбуждении через K-канал легко проходят Rb<sup>+</sup> и особенно Tl<sup>+</sup>, т. е. этот канал избирателен для катионов с небольшой гидратной оболочкой; через Na-канал легко проходят Li<sup>+</sup>, гидроксилламин, гидразин, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, т. е. данный канал избирателен для катионов с большой гидратной оболочкой. Ионы цезия, имеющие самую маленькую гидратную оболочку, не проходят ни через один, ни через другой канал.

По мнению Mullins (1960), стенки каналов имеют фиксированные отрицательные заряды, а просветы каналов обладают определенными размерами, соответствующими размерам ионов с первичной гидратной оболочкой. Через такой канал не могли бы проходить ни ионы, размер которых больше просвета канала, ни значительно меньшие ионы, так как в последнем случае изменилась бы структура наружных гидратных оболочек и появилось бы нежелательное неэкранированное электростатическое поле, которое может взаимодействовать с зарядами стенки канала и затруднять продвижение ионов. Считается, что мембранно-связанные Ca<sup>++</sup> являются регулятором возбудимости: в покое Ca<sup>++</sup> фиксируют «устье» Na-канала и закрывают его; при возбуждении вследствие структурных перестроек Ca<sup>++</sup> замещаются, например Na<sup>+</sup>, и открываются его устья.

Химическая структура каналов еще полностью не выяснена. При внутри- и внеклеточной обработке аксонов фосфолипазами мембрана деполяризуется, но потенциал действия не возникает. Ранее считали, что полярные головки фосфолипидов образуют стенки каналов: непараллельная ориентация этих головок суживает канал, параллельная — открывает. Существует предположение, что липиды являются остовом для белковой стенки каналов. Сторонники липидной природы стенок каналов опираются на классическую модель мембран с двойным липидным слоем. С точки зрения мозаичной модели мембран канал — это водный промежуток между липопротеидными мицеллами. О белковой природе Na-каналов свидетельствуют данные о торможении потенциала действия тиоловыми реагентами, о выключении пассивного транспорта  $\text{Na}^+$  внутриклеточным введением проназы, о необратимой инактивации только транспорта  $\text{Na}^+$  ультрафиолетовыми лучами (при 280 нм) нервного волокна. В составе Na-каналов аксонов имеются карбоксильные группы с  $\text{pK}_a \sim 5,2$ , в составе K-каналов — карбоксильные группы с  $\text{pK}_a \sim 4,6$ .

Попытка объяснить взаимодействие Na-канала с различными модификаторами, инактивирующими канал или предотвращающими его активацию, привела Smythies и соавт. (1974) к гипотезе, что ворота Na-канала содержат полипептид, состоящий из 11 аминокислот: асп-про-глу-про-глу-про-глу-про-асп-про-глу. Кольцевая структура этого полипептида, образующаяся при помощи водородной связи концевых аминокислот (между кислородом карбонила аспартата и амидом глутамата), чувствительна к  $\text{Na}^+$  (с одной гидратной оболочкой) и тетродотоксину. Внутренняя поверхность канала выстлана двумя слоями полипептида про-гли-X-мет-X-глу-цис-глу-X-мет-X (где X — валин или изолейцин). Эти слои связаны липофильными (мет-мет) и водородными (глу-глу) связями, при этом образуется прямоугольный канал с сечением 0,6—0,9 нм. При изменении ориентации  $\alpha\text{-C}-\beta\text{-C}$ -связей глутамата размер канала уменьшается от 0,6 до 0,2 нм (канал закрывается). Миграция катионов по каналу определяется либо иондипольным взаимодействием, либо частичной дегидратацией.

Специфическим блокатором для Na-канала является тетродотоксин<sup>1</sup>, действующий лишь на наружную поверхность возбудимых мембран, а для K-канала — тетраэтиламмоний в концентрации 5—20 мМ, действующий как на наружную, так и на внутреннюю поверхность мембраны. Тетродотоксин в очень низких концентрациях ( $10^{-6}$ — $10^{-7}$  М) необратимо блокирует нервную проводимость. В катионной форме тетродотоксин свя-

<sup>1</sup> Тетродотоксин — аминопергидрохиназолиновое производное, выделяют из яичников икры японской рыбы Fugu или яиц калифорнийской саламандры *Taricha torosa*.



зывается в отношении 1:1 с СООН-группой рецепторного участка поверхности Na-канала. Химическое действие тетродотоксина объясняется высокоосновной гуанидиновой группой в молекуле, которая входит в Na-канал, как пробка в бутылку, и застревает в ней, так как остальная часть молекулы обладает очень большими размерами.

В смешанных Na,Ca-каналах тетродотоксин частично блокирует вход  $Ca^{++}$  в возбудимые клетки и секрецию медиаторов, например блокирует Ca-зависимую спонтанную секрецию ГАМК синапсами и адениловых нуклеотидов при стимуляции электрическим током синапсом. Тетродотоксин не вызывает изменений в ультраструктуре синапсов. Сакситоксин, выделенный из пластинчато-жаберных североамериканских моллюсков, оказывает действие, подобное тетродотоксину.

Вератрин (растительный алкалоид) вызывает стойкую деполяризацию мембран, угнетая фазу инактивации Na-канала. Действие вератрина и его аналогов снимается тетродотоксином.

Анестетики и наркотики блокируют проведение нервного импульса, затрудняя пассивные потоки  $Na^+$  и  $Ca^{++}$  и частично  $K^+$ . Анестетики и барбитураты в больших дозах угнетают Na, K-АТФ-азу и не нарушают ультраструктуру синапсов. Фосфолипиды, выделенные из фракции синаптических мембран, интенсивно связывают  $Ca^{++}$ , причем это связывание тормозится анестетиками (Papanadjoroulos, 1972).

#### СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ВОЗБУДИМЫХ МЕМБРАНАХ ПРИ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ

При использовании физико-химических методов исследования (инфракрасная спектроскопия, светорассеяние и др.) выявлены структурные перестройки мембран в препаратах нервов при стимуляции электрическим током, ведущей к снижению ТМП (Cohen, 1973). Такая стимуляция аксона кальмара ведет к его набуханию за счет избирательного накопления  $K^+$  в примембранной области. Выходящий  $K^+$  деполяризует соседние нейроны и глиальные клетки, т. е. является своеобразным ионным медиатором возбуждения и регулятором межклеточного взаимодействия. Изменение светорассеяния (и двойного лучепреломления мембранных препаратов) при стимуляции аксона объясняется изменением объема межклеточного пространства, утолщением мембран за счет усиления степени гидратации белков, увеличением примембранных слоев.

Интересные результаты получены при использовании ряда флюоресцентных зондов, особенно кислого непроникающего красителя АНС (1-анилинонафталин-8-сульфонат). При деполяризации аксонов кальмара интенсивность флюоресценции ве-

денного в наружную среду АНС увеличивается, а при внутриклеточном введении — уменьшается. При гиперполяризации аксонов интенсивность флюоресценции введенного в наружную среду АНС уменьшается, а при внутриклеточном введении — увеличивается. Изменение флюоресценции коррелирует с изменением величины ТМП и зависит от перераспределения зарядов в мембране. Во всех случаях тетродотоксин не изменял реакцию с АНС (Davilla et al., 1974). Cohen и соавт. (1974), испробовав более 320 различных флюоресцентных зондов, показали, что наилучшие эффекты получаются с мероцианинами. Деполяризация мембран вызывает десорбцию некоторых красителей с окрашенной аксолеммы. Если эту десорбцию отнести к окружению Na-канала, то на 1 канал десорбируется 6—12 анионов фталоцианиновых красителей. Предполагается, что экранирующиеся при деполяризации 6—12 положительно заряженных групп относятся к воротам Na-канала (С. В. Левин, 1976).

В ходе деполяризации нервов обнаруживаются две четкие фазы изменений теплопродукции: первая фаза, сопровождающаяся активацией Na- и K-каналов, приводит к положительной теплопродукции вследствие уменьшения энтропии, что может быть вызвано увеличением упорядоченности структуры мембран, переориентации гидрофобных белков, в том числе и вне каналов; вторая фаза, совпадающая, по-видимому, с восстановлением пассивных ионных потоков и активацией электрогенного Na, K-насоса, приводит к компенсаторной отрицательной теплопродукции. Указанные изменения не являются полностью обратимыми. По мнению Tasaki (1971), в состоянии покоя упаковка мембран «жесткая», при возбуждении — более «рыхлая» за счет лабильности белково-липидных связей, десорбции  $Ca^{++}$  из карбоксильных групп белков и особенно гликолипидов. При перфузии аксонов улитки протеазами увеличивается длительность потенциала действия. Показано, что после деполяризации некоторые белки аксональных мембран становятся чувствительными к протеазам (Takekaka, Yamagishi, 1969).

## РОЛЬ $Ca^{++}$ В ПРОВЕДЕНИИ НЕРВНОГО ИМПУЛЬСА

В возбудимых клетках важное значение имеет и неравномерность распределения  $Ca^{++}$  между клеткой и средой. Суммарная концентрация Ca в нейронах составляет от 1 до 50 мМ, однако концентрация ионизированного (свободного) оценивается в  $10^{-5}$ — $10^{-7}$  М. Во внеклеточной среде  $Ca^{++}$  находятся в основном в свободном состоянии и их количество часто превышает величину общей  $[Ca^{++}]_i$ . Например, в аксоплазме гигантского аксона кальмара из 400 мкмоль Ca только 0,3 мкмоль находится в свободном состоянии, 10 мкмоль Ca связано с анионами

АТФ, глутамата и др. Остальной Са депонирован в митохондриях (Baker, 1972). Входящий поток  $\text{Ca}^{++}$  в покое не превышает 0,5% от потока  $\text{Na}^+$  (Tasaki, 1971).

При возбуждении увеличивается пассивный транспорт  $\text{Ca}^{++}$  внутрь клеток. Это подтверждается увеличением входа  $^{45}\text{Ca}$  при длительной (5—30 мин) стимуляции электрическим током или калиевой деполяризации аксонов кальмара и других изолированных нервов, срезов и синапсом мозга. Степень данного эффекта коррелировала с увеличением пассивного транспорта  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . При стимуляции электрическим током срезов мозга величина ТМП возвращается к норме спустя 2½ мин после ее прекращения (Hillman et al., 1963), что указывает на физиологическую адекватность деполяризующего воздействия. По данным Baker и соавт. (1967), уменьшение  $[\text{Na}^+]_o$  или увеличение  $[\text{Na}^+]_i$  стимулирует поступление  $\text{Ca}^{++}$  в аксоны кальмара, при этом замена внеклеточного  $\text{Na}^+$  на  $\text{Li}^+$  уменьшает активный выход  $\text{Ca}^{++}$  в среду. Авторы отстаивают несколько необычную точку зрения, что увеличение пассивного входа  $\text{Na}^+$  в клетку сопряжено (или вызывает) с усилением оттока  $\text{Ca}^{++}$  из клетки. По мнению Kalix (1969), проверившего данный эффект на блуждающем нерве кролика, обратимое снижение оттока  $\text{Ca}^{++}$  из клеток при замене  $[\text{Na}^+]_o$  на холин объясняется механизмом обменной диффузии, а не активным Са-насосом. Приведенные данные о Na-зависимом транспорте  $\text{Ca}^{++}$  получены и на синапсомах (Blaustein, Oborn, 1975). При  $[\text{Na}^+]_o = 0$  интенсивность поглощения  $\text{Ca}^{++}$  пропорциональна  $[\text{Na}^+]_i$ . По мнению авторов, в каждом участке поглощения с одним ионом кальция конкурируют два иона внеклеточного натрия. Na-зависимое поглощение  $\text{Ca}^{++}$  наблюдается только в целых синапсомах и не происходит в митохондриях. Учитывая, что цианиды и ДНФ тормозят Са—Na-обмен, можно считать, что этот процесс связан с функционированием Na,K-насоса. Высвобождение  $^{45}\text{Ca}$  из синапсом активируется в результате повышения  $[\text{Na}^+]_o$  и  $[\text{Ca}^{++}]_o$  (Blaustein, Ector, 1976). Различают три способа транспорта  $\text{Ca}^{++}$  через возбудимую мембрану: 1)  $\text{Ca}^{++}$  переносятся из среды по Na-каналу, и этот процесс блокируется тетродотоксином при деполяризации и модулируется вератрином; 2)  $\text{Ca}^{++}$  переносятся из среды через Na-независимый, собственный Са-канал; 3)  $\text{Ca}^{++}$  переносятся внутрь клеток путем десорбции мембранно-связанного Са с наружной стороны мембраны, которая обладает свойствами катионообменника. Предполагается, что эти механизмы могут варьировать в различных возбудимых мембранах. По размерам гидратированных радиусов  $\text{Ca}^{++}$  и  $\text{Na}^+$  близки, поэтому  $\text{Ca}^{++}$  могут проходить через Na-канал. Третий способ допускает, что при деполяризации мембранно-связанный Са замещается на Na и высвобождается во внеклеточную среду (частично в цитозоль клетки) и затем переносятся в клетку при помощи первого или второго способа.

Пассивный транспорт  $\text{Ca}^{++}$  в срезы мозга при калиевой деполяризации блокируют прокаиин (20 ммоль) и дифенилгидантоин (0,1 ммоль) (Pincus, Lee, 1973). Из всех субклеточных фракций мозга лишь синапсосомы отвечают усилением входа  $\text{Ca}^{++}$  на воздействие высокими концентрациями КСI. Blaustein (1975) показал, что различные деполяризующие воздействия увеличивают интенсивность флюоресценции зонда в суспензии целых синапсосом мозга крыс, что соответствует снижению ТМП. Воздействие КСI на митохондрии, синаптические мембраны и лизированные синапсосомы не вызывает изменения флюоресценции 3,3'-дипентил-2,2'-оксикарбоцианида. Добавление грамицидина С, увеличивающего проницаемость для  $\text{Na}^+$ , к суспензии синапсосом, в которых  $[\text{Na}^+]_o \ll [\text{Na}^+]_i$  (за счет внесения ингибиторов Na,K-насоса и замены  $\text{Na}^+$  в среде на холин), снижает интенсивность флюоресценции, что свидетельствует о гиперполяризации мембран. Увеличение поступления  $^{45}\text{Ca}$  в синапсосомы при калиевой деполяризации было обратимым, т. е. при дальнейшей замене среды на нормальный раствор Кребса—Рингера наблюдался отток  $^{45}\text{Ca}$  из синапсосом.  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Mn}^{++}$  и  $\text{La}^{++}$  (0,05 мМ) конкурентно блокировали вызванное калиевой деполяризацией поступление  $\text{Ca}^{++}$  в синапсосомы, однако тетродотоксин не влиял на этот процесс. Почему в этих опытах тетродотоксин блокировал вход  $\text{Ca}^{++}$  при деполяризующем воздействии вератрина, не ясно.

В некоторых случаях в лишенной  $\text{Na}^+$  среде гигантские нейроны моллюсков, мышечные волокна ракообразных и насекомых, гладкие мышечные волокна моллюсков и различных органов позвоночных, нейроны спинальных ганглиев способны генерировать «кальциевый» потенциал действия в среде с большой концентрацией  $\text{Ca}^{++}$  (10—200 мМ) или  $\text{Ba}^{++}$ . В этом случае изменение ТМП при возбуждении находится в линейной зависимости от  $\lg[\text{Ca}^{++}]_o$ . Однако первая фаза деполяризации длится довольно долго (несколько секунд и даже минут) в отличие от нормальной волны пикового потенциала действия. Предполагается, что в данном случае  $\text{Ca}^{++}$  переносятся в клетки по особым Ca-каналам или смешанным медленным Na,Ca-каналам, нечувствительным к тетродотоксину, новокаину и блокируемым  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{La}^{+++}$  и верапамилом (Б. И. Ходоров, 1975). В гигантском аксоне кальмара кальциевые потенциалы действия связаны с транспортом  $\text{Ca}^{++}$  по чувствительному к тетродотоксину каналу (Tasaki, 1971).

Имеются данные об отсутствии конкуренции  $\text{Ca}^{++}$  и  $\text{Na}^+$  за Na-канал. Так, повышение  $[\text{Ca}^{++}]_o$  не ослабляет тормозящего действия тетродотоксина на мембрану одиночного перехвата узла (Б. И. Ходоров, 1975). На аксонах кальмара показано, что при деполяризации усиливается поступление  $\text{Ca}^{++}$ , которое можно разделить на две фазы: одна фаза является чувствительной к тетродотоксину, другая — резистентна к нему и блокиру-

ется избытком  $Mg^{++}$ ,  $Mn^{++}$ ,  $Co^{++}$ , верапамилом и препаратом D-600. Именно второй путь поступления  $Ca^{++}$  связан, по-видимому, с секрецией медиаторов (Baker, Glitsch, 1975). Тетродотоксин-независимый вход  $Ca^{++}$  в клетки наблюдается при каллевой деполяризации срезов мозга (Pincus, Lee, 1973). При повышении  $[Ca^{++}]_o$  в 5—20 раз в среде Рингера величина потенциала покоя нервных волокон не меняется, однако увеличивается критический уровень деполяризации и устойчивость мембран к «пробою» при сильной и длительной деполяризации, т. е. нерв становится очень чувствительным к возбуждению. Все это указывает на роль внеклеточного Ca в стабилизации мембран. Ряд подобных Ca катионов ( $La^{+++} \gg Ni^{++} > Ba^{++} > Ca^{++} > Mg^{++}$ ) в отношении стабилизации возбудимых мембран обладает аналогичной способностью связываться с фосфолипидами мембран (Blaustein, Goldman, 1967). Избыток  $[Ca^{++}]_o$  замедляет развитие каллевой деполяризации.

Таким образом, повышение проницаемости мембран для  $Na^+$  при деполяризации зависит от  $[Ca^{++}]_o$ . Полное отсутствие  $Ca^{++}$  во внеклеточной среде (при действии ЭГТА) приводит к обратимому уменьшению возбудимости нервов. Эффекты длительной гиперполяризации зависят от высокой  $[Ca^{++}]_o$ , при этом  $La^{+++}$  и  $Ba^{++}$  более эффективны, чем  $Ca^{++}$ . Если  $Na$ -канал чувствителен к изменениям  $[Ca^{++}]_o$ , то  $K$ -канал — к изменениям pH среды (Hille, 1968).

Очень важными для понимания ионных механизмов возбуждения являются данные о том, что поступление  $Ca^{++}$  внутрь клеток происходит раньше, чем «открытие»  $Na$ -каналов (Baker et al., 1971).

В настоящее время структура Ca-каналов остается еще неясной. Наиболее эффективными блокаторами их являются  $La^{+++}$ ,  $Zn^{++}$ ,  $Cd^{++}$ ,  $UO_2^{++}$  и  $Mn^{++}$  и менее эффективными  $Mg^{++}$ . Избыток поступивших внутриклеточных  $Ca^{++}$  изнутри может «запирать» Ca-канал в мембранах сомы моллюсков (П. Г. Костюк, 1975).

Большое внимание уделяется связывающим Ca белкам синаптических мембран, участвующим в транспорте  $Ca^{++}$  через мембраны и экзоцитозе. Из коры мозга свиньи выделены два связывающих Ca белка; первый — с отн. мол. м.  $13 \cdot 10^3$ , второй — с отн. мол. м.  $46 \cdot 10^3$  (тетрамер).  $K_{дисс}$  для второго белка с  $Ca^{++}$  составляет  $2,5 \cdot 10^{-5}$  M. Связывание  $Ca^{++}$  этим белком конкурентно тормозится  $Mn^{++}$ ,  $Ba^{++}$ ,  $Mg^{++}$  и  $Na^+$ . В печени, почках, щитовидной железе и коре надпочечников второй белок отсутствует, однако некоторое его количество обнаружено в мозговом слое надпочечников, семенниках и в электрическом органе угря (Siegel et al., 1973). Есть указания, что связывающие Ca белки в холинергических и норадреналинергических синапсах различаются по своим свойствам (Siegel, Brooks, 1973). Авторы предполагают, что при деполяризации происходит вы-

свобождение Ca в среду. Являются ли эти белки составной частью Ca-канала, пока сказать трудно. Из синаптических мембран выделены 9 гидрофобных белков, способных связывать  $Ca^{++}$ . Максимальным связыванием  $Ca^{++}$  обладает белок с отн. мол. м.  $16 \cdot 10^3$ , способный избирательно замещаться с одновалентными катионами. Этот белок связывает  $Ca^{++}$  в отношении 1:4. В составе этого белка (после действия трипсина) выявлен кислый пептид, связывающий  $Ca^{++}$ . Этот пептид обнаружен и в других Ca-связывающих белках синаптических мембран (Aboud et al., 1976).

Катипо и соавт. (1976) установили, что  $Ca^{++}$  в низких концентрациях ( $10^{-5}$  М) быстро связываются с рецептором поверхностной мембраны синапсом; рутениевый красный или калиевая деполяризация синапсом в этих условиях тормозит связывание. Однако при высоких концентрациях  $Ca^{++}$  связываются с другими участками мембраны синапсом независимо от действия указанных агентов.

## ИОННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ВОЗБУЖДАЮЩИХ И ТОРМОЗЯЩИХ ПОСТСИНАПТИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИАЛОВ

Взаимодействие возбуждающего медиатора с рецептором пост-СМ приводит к деполяризации и возникновению положительного возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП) от  $-70$  до  $-10$  мВ, который создается за счет резкого одновременного увеличения проницаемости пост-СМ к катионам ( $Na^+$  и  $K^+$ ) в направлении электрохимического градиента. Проницаемость анионов  $Cl^-$  при этом не меняется. Снижение трансмембранного потенциала при ВПСП вызывается тем, что проводящий ток в пост-СМ направлен внутрь эффекторной клетки вследствие усиления проницаемости для  $Na^+$ . Ионные изменения при ВПСП практически нечувствительны к тетродотоксину. По-видимому, ионофоры в пост-СМ при образовании ВПСП имеют отрицательные заряды стенок, поскольку они не пропускают анионы, а пропускают  $Na^+$  и  $K^+$ . В частности, ацетилхолин создает ВПСП в нервно-мышечных синапсах, увеличивая проницаемость для  $NH_4^+$  и  $Ca^{++}$  за счет конкуренции с  $Na^+$ . Возбуждающее действие катехоламинов и гистамина на гладкие мышцы сопровождается усилением транспорта  $Ca^{++}$  внутрь клеток. Ионы кальция являются необходимыми посредниками конечного физиологического действия медиаторов и гормонов на их клетки-мишени.

Возбуждающие синапсы осуществляют короткое замыкание через пост-СМ, при этом мембрана перестает служить преградой для ионов. Например, ацетилхолин, высвободившийся (около  $10^{-17}$  М) при одном импульсе в нервно-мышечных синапсах позвоночных, в течение нескольких миллисекунд вызывает сум-

марный переход не менее  $10^{-12}$  М одновалентных катионов. Такое резкое усиление местного ионного тока через пост-СМ обеспечивается открытием ионофоров после взаимодействия ацетилхолина с холинорецептором.

Расчеты для нервно-мышечных синапсов показывают, что на  $1 \text{ мкм}^2$  пост-СМ может приходиться до 100 проводящих ионы путей, в генерации одного миниатюрного потенциала на пост-СМ принимает участие 1460 активированных каналов-ионофоров. при генерации одного ВПСП через пост-СМ проходит около  $8 \cdot 10^{-10}$  моль/ $\text{см}^2$ , что в 200 раз больше, чем через мембрану при генерации потенциала действия (Katz, Miledi, 1972). Плотность расположения каналов пост-СМ должна быть по крайней мере в 200 раз выше, чем в электрогенной зоне мембраны. При образовании ВПСП и потенциала действия происходит временная деполяризация, однако по амплитуде и продолжительности оба процесса отличны. ВПСП является результатом изменений в электроневозбудимой части мембран, потенциал действия — в их электровозбудимых участках.

На основании ряда данных (продолжительность тока; действие анестетиков, отличное от влияния на электровозбудимую мембрану; избирательное блокирование атропином проницаемости для  $\text{K}^+$ ) высказано предположение, что ионные потоки при ВПСП в нервно-мышечных синапсах разобщены (Л. Г. Магазаник, 1975). Открытие Na- и K-каналов при ВПСП может регулироваться внеклеточными  $\text{Ca}^{++}$ , которые при действии ацетилхолина десорбируются из пост-СМ, возможно, из холинорецептора (Liévgemont et al., 1968). Большие концентрации  $\text{Ca}^{++}$  уменьшают сродство холинорецептора к тубокурарину, в то время как замена  $\text{Na}^+$  сахарозой увеличивает его. По нашим данным (Р. Н. Глебов, А. Н. Мезенцев, 1968),  $\text{Ca}^{++}$  в больших количествах, чем  $\text{Mg}^{++}$ , связываются синаптосомами, однако в присутствии ацетилхолина (2,5 мМ) наблюдается связывание больших количеств  $\text{Mg}^{++}$ , чем  $\text{Ca}^{++}$ . Эти данные впоследствии были подтверждены Madeira, Antunes-Madeira (1973).

Взаимодействие тормозящего медиатора с рецептором пост-СМ приводит к ослаблению возбуждения, т. е. к гиперполяризации и возникновению отрицательного тормозящего постсинаптического потенциала (ТПСП) от  $-70$  до  $-80$  мВ, который создается за счет увеличения проницаемости пост-СМ для малых ионов: для аниона  $\text{Cl}^-$  (вход в клетку) и(или) катиона  $\text{K}^+$  (вход в клетку по электрохимическому градиенту). Например, в маутнеровском нейроне в ацетилхолинреактивных структурах нейронов моллюсков при ТПСП активируется проводимость для  $\text{Cl}^-$ , в мотонейронах спинного мозга — как для  $\text{Cl}^-$ , так и для  $\text{K}^+$ , в гладких мышцах, в мембранах сердца позвоночных — для  $\text{K}^+$ . Антагонисты  $\text{Ca}^{++}$  ( $\text{La}^{+++}$  и  $\text{Mn}^{++}$ ) препятствуют образованию ТПСП в нейронах коры мозга при действии биогенных аминов, но не ГАМК. Увеличение ТМП при

ТПСП вызывается тем, что проводящий ток в пост-СМ направлен из клетки наружу и входит в клетку по остальной электропроводимой поверхности мембраны. При появлении ТПСП увеличивается проводимость для анионов, относительный гидратированный радиус которых превышает гидратированный радиус  $K^+$ . Анионы  $Cl^-$  и  $Br^-$  при внутриклеточной инъекции обратимо превращают гиперполяризацию в деполяризацию. ТПСП увеличивается при деполяризации нейронов и ослабевает при гиперполяризации, причем чрезмерная гиперполяризация вызывает извращение знака ТПСП.

Установлено, что электрогенный  $Na, K$ -насос поддерживает равновесный потенциал для  $K^+$  на более высоком гиперполяризационном уровне, чем потенциал покоя (Hodgkin, 1965). Выяснение ионных механизмов при ТПСП заставило предположить наличие активного  $Cl^-$ -насоса (перенос  $Cl^-$  из клетки), способного снижать равновесный потенциал для  $Cl^-$  к более деполяризованному уровню, чем потенциал покоя. Облегчение ТПСП  $Br^-$  может быть вызвано повышением проницаемости пост-СМ для анионов, развивающимся при действии тормозящего медиатора ГАМК. При образовании ТПСП в отличие от потенциала действия через активированные ионофоры пост-СМ могут проходить многие отрицательно заряженные ионы, даже не характерные для клетки. Течение постсинаптического потенциала во времени определяется скоростью инактивации отработанных медиаторов в синаптической щели, десенситизации рецепторов и конформационных перестроек пост-СМ. Например, именно последним фактором можно объяснить быстро развивающееся ТПСП при действии ГАМК или глицина и медленно развивающееся ТПСП в ЦНС при действии норадреналина или дофамина, конечные эффекты которых опосредованы через систему циклических нуклеотидов. Как правило, амплитуда ТПСП меньше, чем амплитуда ВПСП, однако временные параметры в обоих случаях одинаковы. Возбуждающие рецепторы, имеющие более низкий порог деполяризации, быстро десенситизируются при высоких частотах пресинаптической активации; более высокопороговые тормозящие рецепторы, наоборот, потенцируют свое действие при высоких частотах. Как правило, медленно развивающиеся ТПСП являются чувствительными к  $K^+$ , а быстрые ТПСП чувствительны к  $Cl^-$ . Общим свойством образования ВПСП и ТПСП является увеличение проницаемости тех или иных ионов согласно их электрохимическим градиентам.

Изменение ионной проницаемости, вызываемое действием медиатора на пост-СМ, не зависит от исходной величины ТМП, за исключением действия ацетилхолина на нейроны моллюсков. В этом заключается важное отличие механизма электрического возбуждения, при котором изменение ионной проницаемости определяется уровнем ТМП (Katz, 1968). Создание ТПСП стабилизирует ТМП на уровне потенциала покоя. В результате



этого критический уровень деполяризации клетки достигается труднее и ВПСП должен иметь большую величину, чтобы вызвать возбуждение. Эффекторные нейроны получают информацию в виде импульсов сразу от нескольких нейронов и передают ее далее еще большему числу нейронов. Учитывая, что гиперполяризация шунтирует возбуждающие токи и подавляет возбудимость, возбуждающие и тормозящие синапсы мембраны эффекторного нейрона как бы «конфронтируют» за ТМП. Если этот потенциал снижается до критического уровня, нейрон генерирует импульс, который распространяется далее вдоль аксона и мгновенно аннулирует все другие поступающие импульсы. В течение нескольких миллисекунд на эффекторном нейроне происходит суммация локальных изменений ТМП в виде ТПСР и ВПСР, интеграция конвергирующих сигналов до тех пор, пока суммарный результат не превысит порогового значения. В отличие от импульса типа «все или ничего» в нервномышечных синапсах позвоночных, который стабильно (без изменения амплитуды) передается от одного нейрона большому числу мышечных волокон, процесс интеграции центральных и некоторых периферических синапсов протекает на подпороговых уровнях ТМП.

Центральный нейрон, по выражению Katz, представляет собой как бы нервную систему в миниатюре: он принимает афферентные импульсы через сому и дендриты, интегрирует входные сигналы и отвечает генерированием импульсов в аксоне, далее выходной сигнал передается эфферентным клеткам. Периферические нервы передают от органов чувств в ЦНС афферентные сигналы, откуда после интегрирования поступают эфферентные сигналы, быстро передающиеся на периферию, к исполнительным органам.

#### ОСМОТИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ СИНАПТОСОМ

Синаптосомы, как и другие сфероидные структуры (эритроциты, митохондрии, изолированные клетки), мембраны которых ограничивают и сохраняют целостной цитоплазму нервных окончаний, проявляют свойства осмометров. В гипертонической среде синаптосомы сморщиваются, в гипотонической среде набухают и разрушаются. Сморщенные синаптосомы могут быть восстановлены путем переноса в менее концентрированный гипертонический раствор. Синаптосомы не являются идеальными осмометрами: сахара проникает в них медленно, и, если после погружения в сильные гипертонические растворы сахарозы (например, 0,8 М) содержание сахарозы в них становится равным 0,32 М, они могут разрушиться. По этой причине синаптосомы, погруженные в 0,8 М раствор сахарозы (после разделения ткани в градиенте плотности), обычно уравниваются не 0,32 М, а 0,40 — 0,45 М раствором сахарозы (Whittaker,

1965). В гипотонических растворах из синапсом высвобождаются не только ионы, но и цитоплазматические ферменты (например, лактатдегидрогеназа). Осмотически чувствительный объем в синапсомах для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  составляет около 75% и для  $\text{Cl}^-$  — не более 90—95% (Marchbanks, 1975), т. е. соответствует внутреннему объему этих структур. В гипертонических растворах  $\text{NaCl}$  и  $\text{LiCl}$  синапсомы проявляют свойства идеальных осмометров: соблюдается линейная зависимость значения интенсивности светорассеяния суспензии синапсом при 520 нм от значения  $1/[\text{Met}^+]_o$  (Kamino et al., 1973). Для  $\text{KCl}$  этой линейной зависимости не существует. Замена в растворе части сахарозы или  $\text{NaCl}$  на  $\text{KCl}$  вызывала набухание синапсом при  $[\text{KCl}]_o > 30$  ммоль, причем увеличение объема пропорционально  $\lg[\text{K}^+]_o$ . ЭДТА усиливает набухание синапсом в присутствии  $\text{KCl}$ . Убаин и N-этилмалеимид не влияют на действие  $\text{KCl}$ . Сравнительно хорошей проникающей способностью обладают  $\text{K}^+$  и  $\text{Na}^+$ , средней —  $\text{NH}_4^+$ , а также анионы ацетата, бикарбоната, медленной —  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  и холин, анионы оксалата, фосфата и сульфата (Keen, White, 1971). Синапсомы в 19 раз более проницаемы для  $\text{K}^+$ , чем для  $\text{Na}^+$ , при этом грамицидин D, как и в случае митохондрий, избирательно увеличивает проницаемость для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ . В изотонической многокомпонентной солевой среде набухание или сморщивание синапсом зависит от соотношения  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  и наличия  $\text{Ca}^{++}$ .

Убаин (1 мМ) и колхицин (1 мМ) вызывают увеличение интенсивности светорассеяния суспензии синапсом, инкубированных в растворе Кребса — Рингера (Ю. Г. Саудалов и др., 1976). Таким образом, осмотическая чувствительность синаптических мембран терминалей является важным фактором в механизме сопряжения деполяризации и секреции медиаторов.

#### СВОЙСТВА И ФУНКЦИИ $\text{Na, K-ATP-азы}$ СИНАПТИЧЕСКИХ МЕМБРАН

Активное выведение  $\text{Na}^+$  или активное поступление  $\text{K}^+$  внутрь клеток связано со снижением содержания богатых энергией фосфорных эфиров, в частности АТФ. Сердечные гликозиды, в том числе убаин (строфантин G), являются специфическими блокаторами  $\text{Na, K-насоса}$  (Schatzmann, 1953). Активный перенос  $^{42}\text{K}$  в синапсомы мозга крыс требует оптимальной концентрации в среде  $\text{Na}^+$  (50 мМ) и  $\text{K}^+$  (10 мМ), в этом случае активный транспорт  $\text{K}^+$  тормозят убаин,  $\text{KCN}$ , ДНФ и моноиодацетат (Bradford, 1969; Marchbanks, 1975). При торможении  $\text{Na, K-насоса}$  в синапсомах увеличивается содержание  $\text{Na}^+$  и уменьшается содержание  $\text{K}^+$ .

В 1957 г. во фракции мембран периферических нервов была открыта  $\text{Na, K-активируемая Mg-зависимая АТФ-аза}$  (Skou,

1957). Эта АТФ-аза параллельно с гидролизом АТФ участвует в осуществлении активного транспорта  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  через клеточные мембраны. После открытия этого важного фермента последовало большое количество работ по изучению его свойств, регуляции и функции (Б. А. Ташмухамедов, А. И. Гагельганс, 1973; Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский, 1975; А. А. Болдырев, 1977; Schwartz et al., 1975). В мембранах нейронов транспортная  $\text{Na, K-ATP}$ -аза, помимо участия в механизме  $\text{Na, K-насоса}$ , способствует созданию ТМП возбудимых мембран и играет важную роль в механизме возбуждения, захвата медиаторов терминалями.

$\text{Na, K-ATP}$ -аза присутствует в мембранах клеток, в том числе в нервной ткани. Максимальная активность обнаружена в мозге, почках и железистых клетках. После фракционирования нервной ткани максимум активности  $\text{Na, K-ATP}$ -азы проявляется в синапсосомах и микросомах, а при дальнейшем разделении синапсосом — в синаптических мембранах. В митохондриях и в СП  $\text{Na, K-ATP}$ -аза отсутствует. В мембранах аксона кальмара количество молекул  $\text{Na, K-ATP}$ -азы (по связыванию с убаином) равно  $10^3$ — $10^5$  на  $1 \text{ мкм}^2$  (Baker, Willis, 1972). Расчеты показывают, что  $\text{Na, K-ATP}$ -аза занимает 1—2% всей площади возбудимой мембраны.

Для проявления активности  $\text{Na, K-ATP}$ -азы в мембранах необходимо наличие в инкубационной среде  $\text{Na}^+$  (70—150 мМ),  $\text{K}^+$  (5—20 мМ) и  $\text{Mg}^{++}$  (3—5 мМ). Ионы  $\text{Mg}$  могут быть частично заменены  $\text{Mn}^{++}$ ; ионы  $\text{K}$ — $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  и  $\text{Li}^+$ , а ионы  $\text{Na}$  незаменимы. Убаин ингибирует только  $\text{Na, K-ATP}$ -азу, но не влияет на  $\text{Mg-ATP}$ -азу. Двухвалентные ионы:  $\text{Cd}^{++}$ ,  $\text{Co}^{++}$ ,  $\text{Ni}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  (0,1—5 мМ) и особенно  $\text{Pb}^{++}$ ,  $\text{Cu}^{++}$  и  $\text{Hg}^{++}$  ( $10^{-5}$  М), являются ингибиторами фермента. Интересно действие  $\text{Ca}^{++}$ , проявляющееся только в том случае, если  $\text{Ca}^{++}$  находится внутри клетки, и связанное с возможным влиянием на первые этапы гидролиза АТФ. Поэтому низкие концентрации  $\text{Ca}^{++}$  внутри клеток являются необходимым условием для работы  $\text{Na, K-насоса}$ , а в синаптических структурах  $\text{Ca}^{++}$  могут быть естественным регулятором  $\text{Na, K-ATP}$ -азы. Торможение  $\text{Ca}^{++}$  конкурентно предотвращается увеличением содержания  $\text{Mg}^{++}$  в инкубационной среде.

$\text{Na, K-ATP}$ -аза синапсосом обладает большей субстратной специфичностью, чем  $\text{Mg-ATP}$ -аза. Для  $\text{Na, K-ATP}$ -азы в физиологических условиях АТФ является единственным субстратом. Значение  $K_m$  для АТФ составляет 0,1—0,2 мМ. По кинетическим параметрам свойства  $\text{Na, K-ATP}$ -азы синаптических мембран, микросом мозга и нейроглии отличны, что объясняется различным гидрофобным и липидным окружением молекулы  $\text{Na, K-ATP}$ -азы в составе тех или иных мембран. По данным Skou (1973), в молекуле  $\text{Na, K-ATP}$ -азы есть по крайней мере три различных активных центра: для АТФ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ .

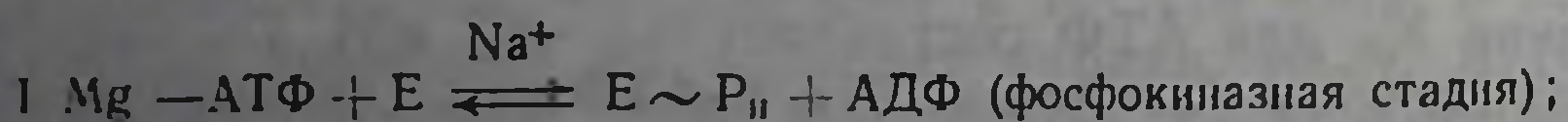
Натриевый центр находится на внутренней стороне клеточной мембраны, при этом  $K^+$  способны конкурентно связываться с этим центром, а калиевый центр находится на внешней поверхности мембраны, при этом  $Na^+$  не способны конкурировать с  $K^+$  за активный центр фермента. Внутриклеточное соотношение  $Na^+/K^+$  более существенно для регуляции активности  $Na,K$ -АТФ-азы, чем внеклеточное их соотношение. Торможение  $Na,K$ -АТФ-азы, таким образом, можно наблюдать при неполной «оккупации» натриевого и калиевого центров, например: 1) при снижении  $[Na^+]_o$  на фоне оптимальной  $[K^+]_o$ ; 2) при увеличении  $[K^+]_o$  на фоне оптимального  $[Na^+]_o$ ; 3) при увеличении  $[Na^+]_o$  на фоне низкого значения  $[K^+]_o$  ( $\ll 10$  мМ). Взаимодействие  $Na^+$  и  $K^+$  с  $Na,K$ -АТФ-азой мембран мозга имеет аллостерический характер. Все модели активного переноса ионов основаны прежде всего на аллостерическом характере регуляции активности  $Na,K$ -АТФ-азы. На основании данных о наличии трех различных активных центров возникло представление о том, что молекула  $Na,K$ -АТФ-азы представляет собой большую глобулу, размеры которой совпадают с толщиной мембраны.

Считается, что в условиях снижения активности фермента, приводящих к увеличению  $[Na^+]_i$ , за счет последнего активируется синтез мРНК, на матрице которой синтезируется новая порция молекул  $Na,K$ -АТФ-азы (Boardman et al., 1974).

Очищенная  $Na,K$ -АТФ-аза имеет отн. мол. м. около  $2 \cdot 10^5$  и состоит из двух субъединиц: каталитической (отн. мол. м.  $98 \cdot 10^3$ ) и регуляторной (отн. мол. м.  $55 \cdot 10^3$ ), причем последняя является сialogликопротеидом (Schwartz et al., 1975). Соотношение этих субъединиц в различных  $Na,K$ -АТФ-азах колеблется. Антитела к гликопротеиду ингибируют активность  $Na,K$ -АТФ-азы, что свидетельствует о важности этой субъединицы в молекуле фермента (Hokin, 1975). При фосфорилировании  $Na,K$ -АТФ-азы демаскируются SH-группы в ее каталитической субъединице. Добавление олигомицина или уабаина к фосфорилированному ферменту способствует более полному раскрытию SH-группы фермента.

Сильными ингибиторами  $Na,K$ -АТФ-азы, помимо классического уабаина, являются  $\alpha$ - и  $\beta$ -ненасыщенные кетоны, например 5,7,3',4'-тетраоксифлавин или лютеолин, алкалоид с бензофенантридиновым ядром сангинарин.

Гидролиз АТФ  $Na,K$ -АТФ-азой является многоступенчатым:



Первая стадия гидролиза АТФ состоит в активируемом натрием фосфорилировании конечным фосфатом АТФ молекулы фермента с образованием макроэргического соединения (переносчика или носителя катионов).

Вторая стадия, имеющая непосредственное отношение к переносу катионов, отражает зависимое от Mg образование немacroэргического соединения, вследствие чего может меняться положение переносчика в полярной мембране. Этот процесс является лимитирующей стадией Na,K-АТФ-азной реакции (А. А. Болдырев, 1977). Третья стадия — это активируемое K<sup>+</sup> дефосфорилирование комплекса E—P<sub>n</sub>.

Если Na<sup>+</sup> и АТФ необходимы на внутренней стороне мембраны, то K<sup>+</sup> — на наружной ее стороне. Считается, что первоначально γ-фосфатный остаток АТФ присоединяется к карбоксилу глутаминовой или аспарагиновой кислоты в молекуле фосфокиназного компонента Na,K-АТФ-азы и отщепляется от молекулы АТФ (реакция АТФ—АДФ-обмена). Затем происходит изменение положения в промежуточном соединении P<sub>n</sub>, который образует связь с гидроксилом серина и азотом гистидина активного центра фосфатазного компонента Na,K-АТФ-азы, и, наконец, осуществляется гидролиз нестабильного соединения с получением исходной ферментной системы и свободного фосфата.

Первую стадию могут тормозить Ca<sup>++</sup>, вторую — N-этилмалеимид, олигомицин, этакриновая кислота и диметилсульфоксид, третью — сердечные гликозиды (например, убаин). Фармакологическая активность растительных гликозидов обусловлена не строением их углеводного компонента, а структурой стероидного аглюкона типа строфантина G или дигитоксина, состоящего из циклопентанпергидрофенантренового основания с 5- или 6-членным ненасыщенным лактоном. Помимо убаина и дигитоксина, способностью специфически блокировать Na,K-насос и Na,K-АТФ-азу обладают такие гликозиды, как строфантин K, дигоксин, ланатозид C или B, цимарин, сцилларен A и олиторизид. Специфический необратимый ингибитор Na,K-АТФ-азы убаин стабилизирует комплекс E—P<sub>n</sub> на наружной стороне мембраны. Связывание убаина с Na,K-АТФ-азой активируется Na<sup>+</sup>, АТФ и Mg<sup>++</sup>, но частично тормозится при увеличении [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. Связывание <sup>3</sup>H-убаина синапсомы находится в обратной зависимости от [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. Эффект торможения убаином зависит от длительности преинкубации с препаратом мембран и наиболее значителен при низких концентрациях [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub> (0,5—5 мМ). Торможение фермента убаином (0,1—1,0 мМ) почти не зависит от изменения [K<sup>+</sup>]<sub>o</sub>. Связывание убаина с Na,K-АТФ-азой в отсутствие АТФ (фермент «молчит») обратимо. Связывание убаина является высокоизбирательным (с появлением на поверхности фосфорилированной формы белка) и необратимым. Введение убаина внутрь аксона не влияет на Na,K-насос и активность Na,K-АТФ-азы. Взаимодействие

уабайна преимущественно с фосфорилированной формой белка объясняется тем, что фосфорилирование увеличивает подвижность белка в мембране, при этом возрастает вероятность появления комплекса  $E-P_n$  на ее наружной стороне. Механизм действия уабайна на калиевый активный центр  $Na, K$ -АТФ-азы еще неясен. Имеются две точки зрения: либо уабайн реагирует через лактоновое кольцо с ацилфосфатным продуктом, либо аллостерически взаимодействует с регуляторной субъединицей, т. е. с синалогликопротеидом, фиксируя носитель ( $E-P_n$ ) на наружной стороне мембран. Механизм стимуляции уабайна в очень низких концентрациях ( $10^{-7}$ — $10^{-15}$  М) на  $Na, K$ -АТФ-азу мозга пока не ясен. В этом случае  $K^+$  не влияют на данный эффект (Palmer et al., 1966). Повышение  $[K^+]_o$  снимает тормозящее действие таких ингибиторов, как этакриновая кислота (сильный диуретик), олигомицин.

Третью стадию  $Na, K$ -АТФ-азной реакции в опытах *in vitro* имитирует  $K$ -активируемая фосфатаза, субстратами которой могут быть ацетил-, пара-нитрофенил-, карбамил- и умбеллиферонфосфат. Гидролиз этих веществ  $Na, K$ -АТФ-азой блокируется уабайном и не активируется  $Na^+$ . Таким образом, активируемый  $K^+$  гидролиз указанных субстратов имитирует процесс гидролиза фосфорилированного промежуточного соединения ( $E-P_n$ )  $Na, K$ -АТФ-азы. Стимулируемая  $K^+$  пара-нитрофенилфосфатаза или ацетилфосфатаза обнаруживается в синаптических мембранах. Энергия активации для гидролиза этих субстратов почти в 2 раза меньше, чем для  $Na, K$ -АТФ-азы синапсом (13 ккал/моль).

Glynn (1973), Post и соавт. (1974) показали принципиальную обратимость всех стадий  $Na, K$ -АТФ-азной реакции. Удалось продемонстрировать чувствительный к уабайну синтез АТФ. Показано, что на 1 моль расщепившейся АТФ 3  $Na^+$  активно переносятся наружу, а 2  $K^+$  — в клетку. Такой неэквивалентный активный перенос  $Na^+$  и  $K^+$  способствует разделению заряда на мембране (понятие электрогенного активного транспорта). Величина потенциала покоя возбудимой мембраны определяется интенсивностью электрогенного  $Na, K$ -насоса. Такая зависимость обнаружена в поперечнополосатых и гладких мышцах, в нейронах симпатических ганглиев, мотонейронах спинного мозга, миелиновых волокнах млекопитающих, нейронах ЦНС беспозвоночных (П. Г. Костюк, 1975). Снижение ТМП, зависящего от электрогенного  $Na, K$ -насоса, удается наблюдать при уменьшении температуры (понижение на  $10^\circ C$  вызывает изменение потенциала больше чем на 3%), при действии уабайна, ингибиторов дыхания и гликолиза; увеличение потенциала создают избыточной  $[Na^+]_i$ , либо внутриклеточным введением  $Na^+$ , либо инкубацией нервов при температуре  $0$ — $4^\circ C$  при  $[K^+]_o = 0$  и последующим переносом препаратов в среду при  $20^\circ C$ .

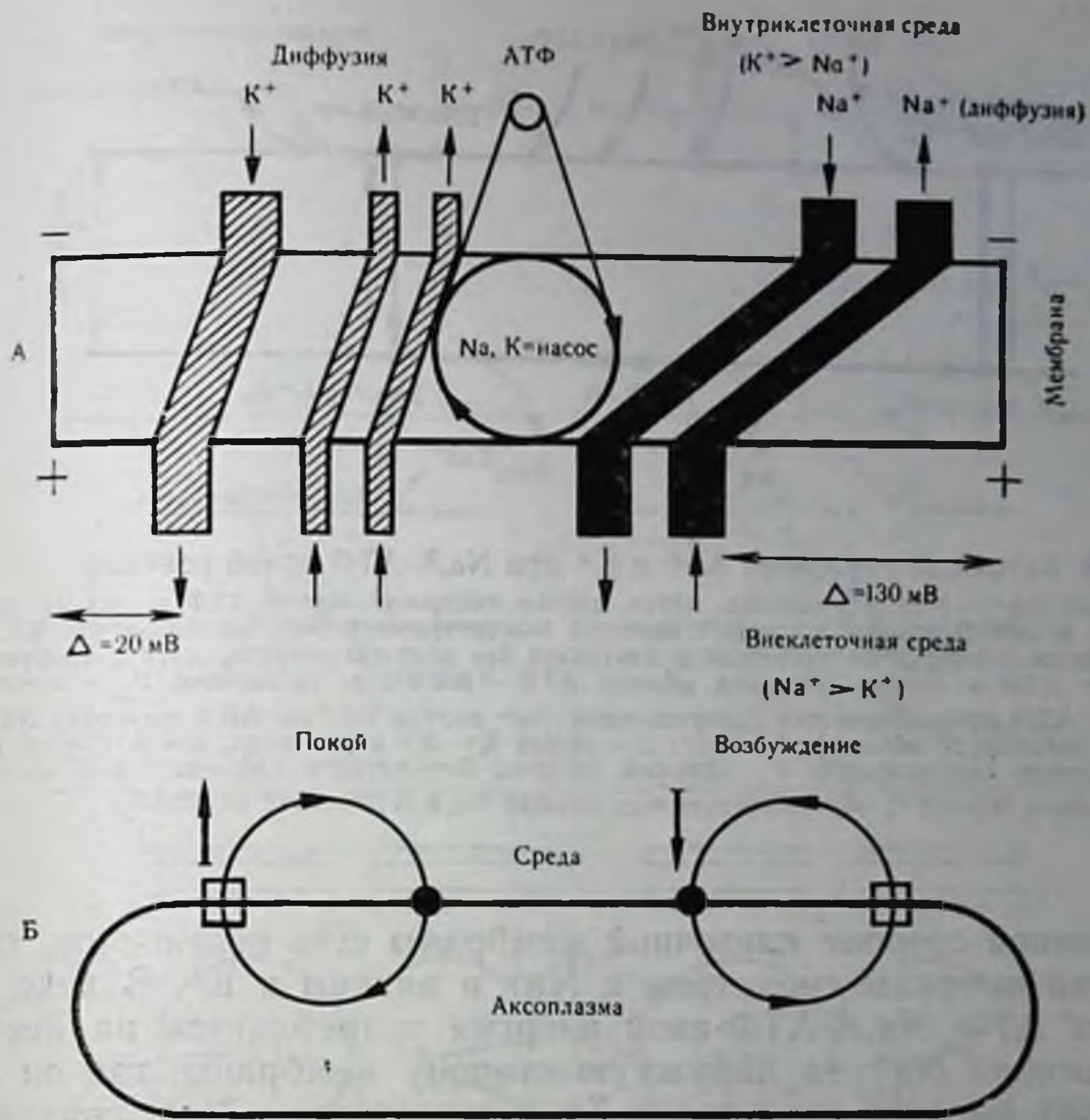


Рис. 13. Пассивные и активные потоки  $Na^+$  и  $K^+$  (А) и направление ионных токов в покое и возбуждении (Б).

А — пассивный поток  $Na^+$  направлен по градиенту концентрации и электрического поля из среды в клетку. Большая часть пассивного потока  $K^+$  направлена по градиенту концентрации из клетки в среду, который частично компенсируется встречным пассивным потоком против градиента поля. Активный поток  $Na^+$  больше, чем таковой для  $K^+$ . Ширина черных и заштрихованных полос соответствует величине ионных потоков. Значение  $\Delta$  означает абсолютную разность в милливольтгах между потенциалом покоя и равновесным потенциалом для  $Na^+$  и  $K^+$  соответственно; Б — квадратом обозначен  $K^+$ -канал, черной точкой —  $Na^+$ -канал, стрелками — исходный вектор тока ионов.

Изменяется ли степень электрогенности  $Na, K$ -насоса (колебания от электронейтральности до электрогенности) при смене состояний покой — возбуждение, пока неясно, хотя соотношение электрогенности в любых физиологических условиях принято считать постоянным. Электрогенный режим работы  $Na, K$ -насоса можно рассчитать путем сравнения равновесных потенциалов для  $Na^+$  и  $K^+$  и потенциала покоя. Напомним, что разница потенциалов для  $Na^+$  по обе стороны мембраны равна 130 мВ, а для  $K^+$  — 20 мВ (рис. 13). Ясно, что для поддержания постоянного соотношения  $Na^+$  и  $K^+$  в клетке для «откачки»  $Na^+$  необходим более мощный насос, чем для «закачивания»  $K^+$ .

Механизм  $Na, K$ -насоса объясняется наличием особых переносчиков, избирательных для  $Na^+$  и  $K^+$ . Предполагается, что на

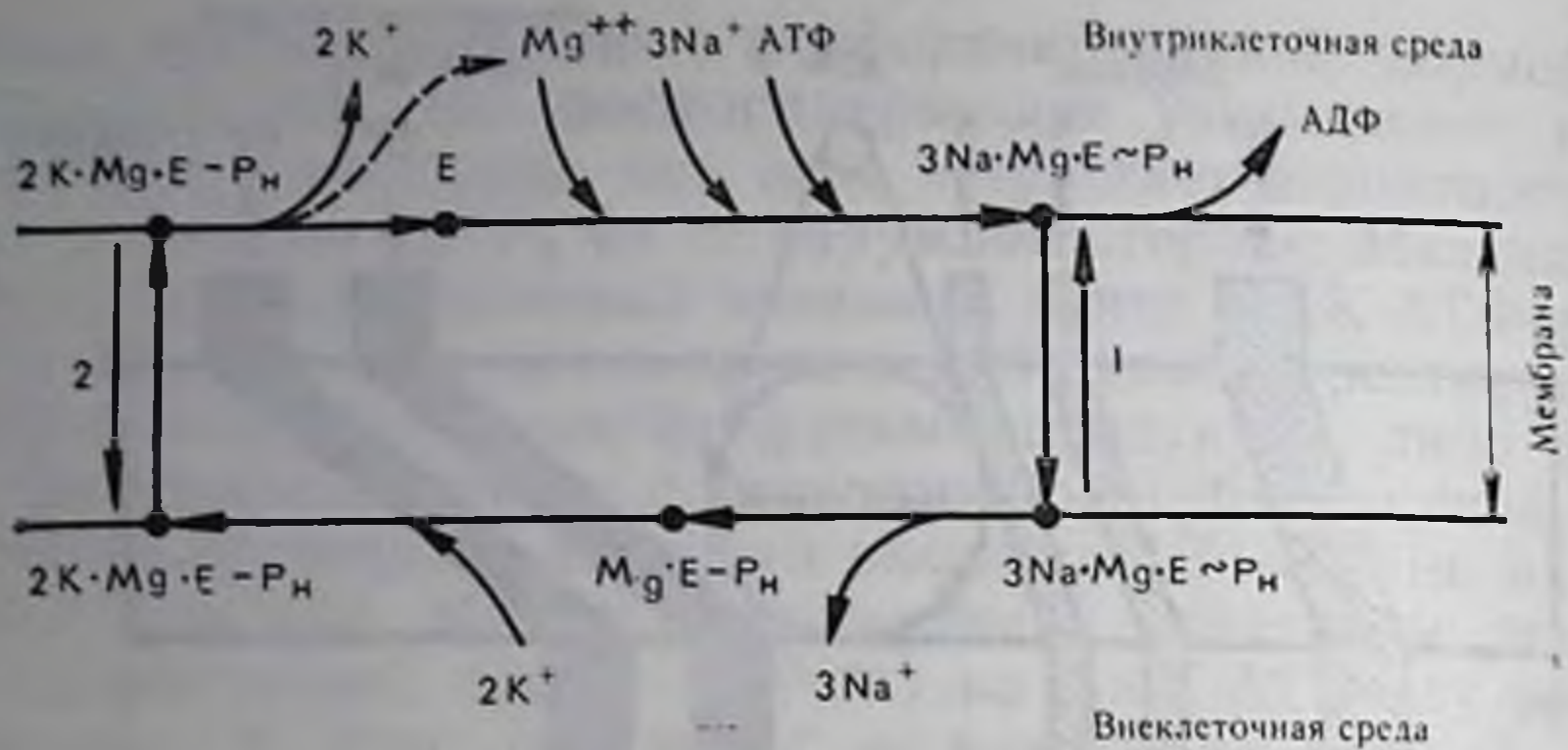


Рис. 14. Активный транспорт  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  при  $\text{Na,K-ATP-азной}$  реакции.

1 — обмен  $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$  в условиях, когда клетки содержат  $\text{Na}^+$  и АТФ в низких концентрациях и инкубированы в среде с высокой концентрацией  $\text{Na}^+$ , но лишенной  $\text{K}^+$ . Данный процесс блокируется уабаином и протекает без затраты энергии, хотя и требует присутствия АТФ в клетке (реакции обмена АТФ — АДФ), т. е. перенос  $\text{P}_{\text{H}}$  с комплекса  $\text{E-P}$  на АДФ сопровождается возвращением  $\text{Na}^+$  внутрь клетки. АДФ тормозит  $\text{Na,K-на-сос}$ , но активирует обмен  $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$ ; 2 — обмен  $\text{K}^+ - \text{K}^+$  в условиях, когда клетки содержат высокие концентрации  $\text{P}_{\text{H}}$ . Данный процесс блокируется уабаином и объясняется, как и обмен  $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$ , обратимостью всех стадий  $\text{Na,K-ATP-азной}$  реакции.

внутренней стороне клеточной мембраны есть переносчик, обладающий высоким сродством к  $\text{Na}^+$  и низким к  $\text{K}^+$ . В ходе гидролиза АТФ  $\text{Na,K-ATP-азой}$  энергия потребляется на переход переносчика  $\text{Na}^+$  на наружную сторону мембраны, где он приобретает высокое сродство к  $\text{K}^+$  и теряет его к  $\text{Na}^+$ ; связав  $\text{K}^+$ , переносчик мигрирует к внутренней стороне мембраны, где теряет  $\text{K}^+$ , и вновь приобретает высокое сродство к  $\text{Na}^+$ . Следовательно, сродство переносчика к определенному катиону зависит от того, на какой стороне мембраны он находится. Это свойство переносчика определяется структурной и химической анизотропией клеточных мембран, т. е. различным химизмом поведения переносчика на той или другой стороне мембраны. Таким образом, энергия гидролиза АТФ в ходе  $\text{Na,K-ATP-азной}$  реакции затрачивается на миграцию переносчика в мембране и на изменение его сродства к катионам, т. е. на количество перемещенных катионов (рис. 14, 15).

Миграция переносчиков («челночные рейсы») в мембране может быть объяснена наличием тепловых колебаний липопротеидной глобулы  $\text{Na,K-ATP-азы}$ , а  $\text{K}^+$  и частично  $\text{Mg}^{++}$  во внеклеточной среде способствуют конформационным изменениям в структуре молекулы  $\text{Na,K-ATP-азы}$ , приводящим к потере макроэргических свойств комплекса  $\text{E-P}_{\text{H}}$  (В. К. Лишко, 1969).

Некоторые доказательства наличия конформационных изменений в  $\text{Na,K-ATP-азе}$  синаптических мембран мозга морских свинок получены при изучении флуоресценции (при связывании гидрофобной области мембран с зондом) АНС (Nagai et al., 1972). В этих условиях в присутствии  $\text{Mg}^{++}$  и АТФ добавление



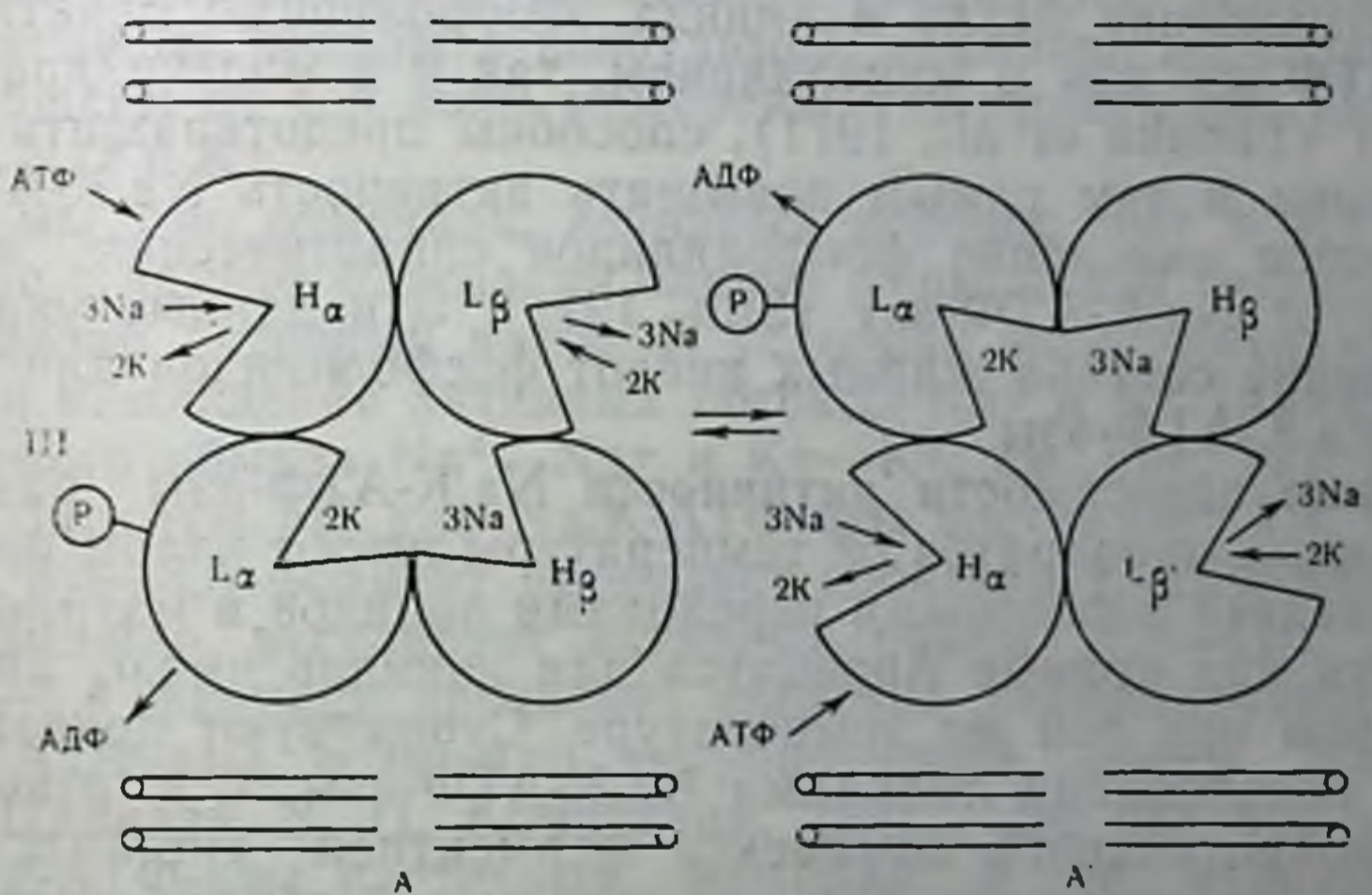
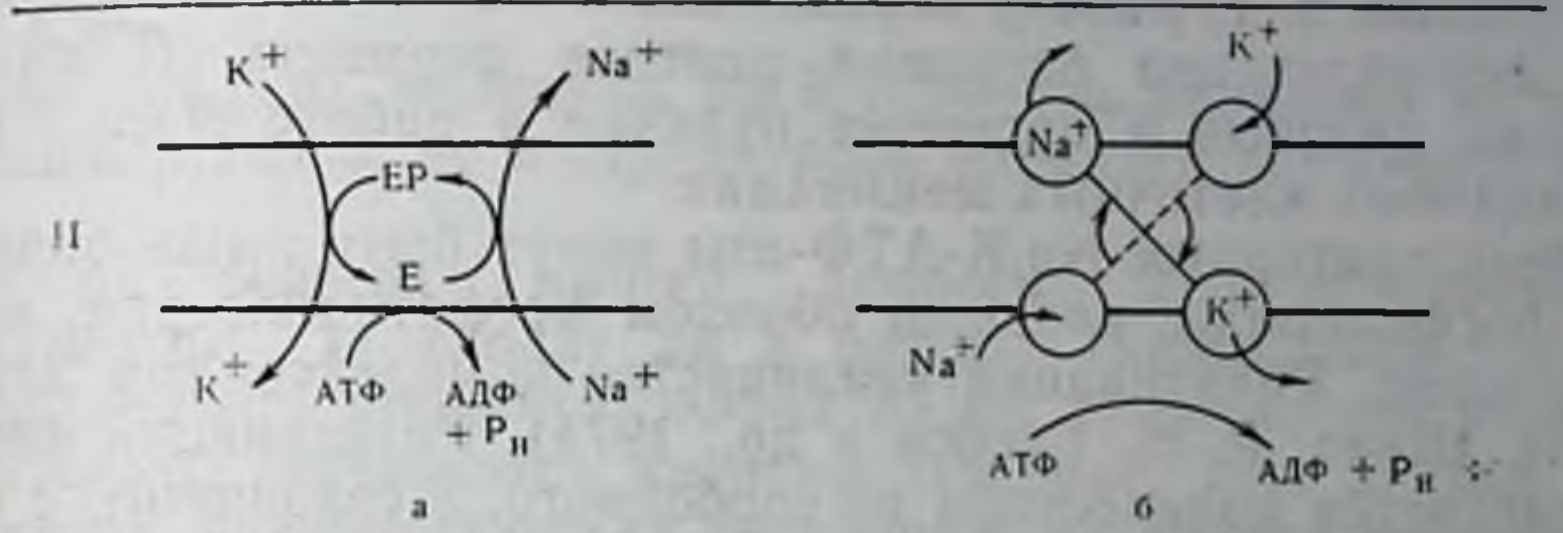
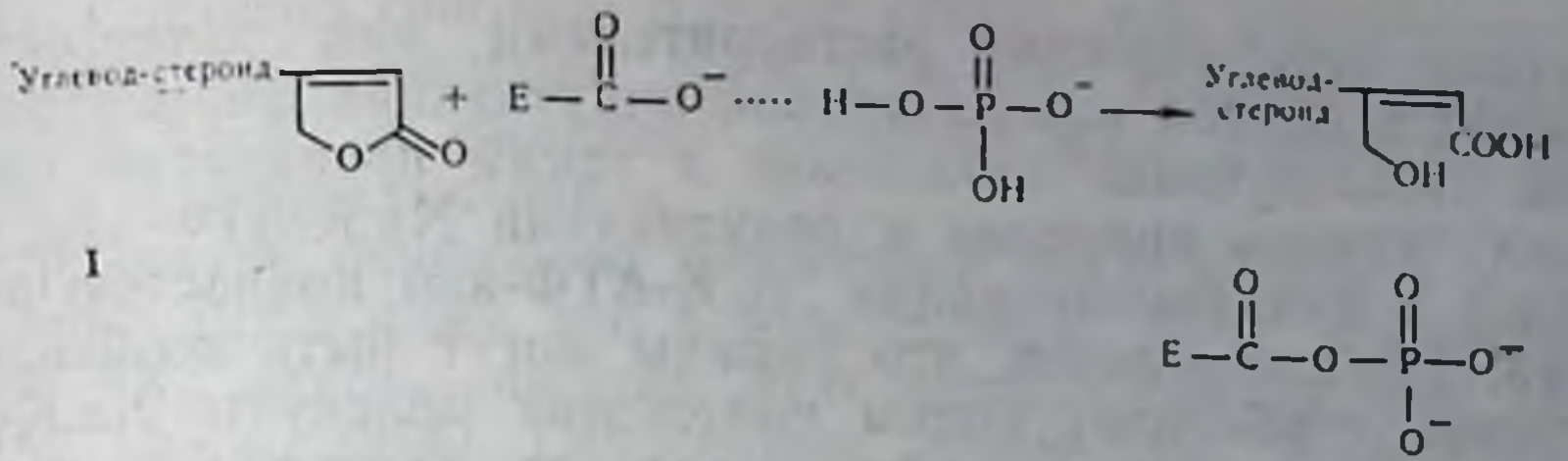


Рис. 15. Механизмы функционирования Na,K-АТФ-азы и Na,K-насоса.

I — возможный путь действия убаина на ацилфосфатный промежуточный продукт; II — два типа работы Na,K-насоса: путем последовательного (а) и одновременного (б) переноса. Сплошная линия — свободные, прерывистая — занятые активные центры; III — модель одновременного активного транспорта  $Na^+$  и  $K^+$ , где Na,K-АТФ-аза представлена как тетрамер ( $\alpha_2\beta_2$ ):  $\alpha$ -каталитическая,  $\beta$ -регуляторная гликопротеидная субъединица. H и L — натриевый и калиевый активные центры. Имеется два центра, связывающих АТФ, один из которых фосфорилируется, а другой активирует натриевый центр. Сродство с АТФ увеличивается при действии  $K^+$ . А и А' — различные конформационные состояния.

в среду  $Na^+$  индуцирует увеличение интенсивности флуоресценции, однако  $K^+$  в присутствии  $Mg^{++}$ , АТФ и  $Na^+$  уменьшали ее, причем эффект  $K^+$  снимался убаином.

Na,K-АТФ-аза представляет собой липопротеидный комплекс. Об этом свидетельствует то, что удаление липидов из мембранных препаратов различными способами (обработка фосфо-

липазами, органическими растворителями или детергентами) приводит к полной или частичной инактивации ферментной системы. Последующее добавление к таким препаратам определенных липидов приводит к реактивации Na,K-АТФ-азы. Роль липидов в функционировании Na,K-АТФ-азы полностью не выяснена. Предполагается, что липиды могут быть необходимым фактором, стабилизирующим положение молекулы Na,K-АТФ-азы в мембране; они способны определять характер транслокационной стадии, т. е. работу переносчиков  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , и необходимы для формирования активных центров фермента. С липидами связаны видовые и органые отличия в работе Na,K-АТФ-азы в различных клеточных мембранах.

Реактиваторами Na,K-АТФ-азы могут быть лишь определенные фосфолипиды, главным образом фосфатидилсерин, а также холестерин. Реактивация усиливается комплексонами для  $\text{Ca}^{++}$  (В. И. Швец, Р. Н. Глебов и др., 1974). Реактивация фермента определяется количеством не свободного, а связанного с белком фосфолипида, при этом существует оптимальное для реактивации соотношение белка и липида. Фосфолипиды реактивируют Na,K-АТФ-азу как в мицеллярном, так и в молекулярном состоянии (Тапака et al., 1971), способны предотвращать агрегацию белка и тем самым повышать активность Na,K-АТФ-азы. Перекисное окисление фосфолипидов синаптических мембран ингибирует Na,K-АТФ-азу (Sun, 1971). Эти данные указывают на значение состава жирных кислот фосфолипидов для реактивации Na,K-АТФ-азы.

Кривые зависимости активности Na,K-АТФ-азы различных мембранных препаратов от температуры имеют излом при  $20^\circ\text{C}$ , что совпадает с фазовыми переходами липидов в матрикс мембран, так как кривые Аррениуса для липидов имеют аналогичный излом при той же температуре. Существуют доказательства, что реактивация липидами Na,K-АТФ-азы, т. е. реконструкция липопротеидного комплекса ферментной системы, имеет существенное значение для лимитирующей транслокационной стадии (Barnett, Palazzotio, 1974), поскольку Na-АТФ-аза (при рН 8,6), фосфорилирование, K-ацилфосфатаза и константа скорости связывания убаина молекулой Na,K-АТФ-азы характеризуются линейной зависимостью от температуры. Авторы считают, что стадией Na,K-АТФ-азной реакции, регулируемой фазовыми переходами липидов мембран, является переход фермента из формы  $\text{K}-\text{E}-\text{P}_{ii}$  в форму  $\text{Na}-\text{E}-\text{P}_{ii}$  (см. рис. 14). По мнению этих же авторов, при  $37^\circ\text{C}$  эмульсия липидов состоит из мозаичной смеси «жидких» и «упорядоченных» (квазикристаллических) структур. Молекулы Na,K-АТФ-азы в высокоупорядоченной области липидов менее активны, чем молекулы фермента, находящиеся в «жидких» структурах.

Этим можно объяснить особенности действия детергентов («активирование» или «торможение» активности Na,K-АТФ-

азы), которые изменяют структурированность липидов в мембранах. Согласно гипотезе Barnett (1973), при структурированной организации липидов Na,K-АТФ-аза стабилизируется в состоянии  $E-P_n$ , в «жидкой» липидной фазе фермент возвращается в исходное состояние.

Встраивание очищенной гомогенной Na,K-АТФ-азы в липосомы приводит к тому, что в присутствии АТФ наблюдается перенос  $^{22}\text{Na}$  внутрь липосом. Этот процесс блокируется убаином (М. Нокін, 1974). Гомогенные препараты Na,K-АТФ-азы после удаления из них детергентов образуют глобулы диаметром 6—8 нм.

Таким образом, молекулы Na,K-АТФ-азы являются не только функциональной, но и структурной единицей клеточной мембраны.

Еще не решены многие вопросы функционирования Na,K-АТФ-азы: 1) входит ли в состав фосфорилированного макроэргического продукта обмена АДФ; 2) синхронно или последовательно переносятся катионы (см. рис. 15); 3) как осуществляется физиологическая регуляция; 4) какова степень сопряженности активного и пассивного транспорта. По-видимому, нонселективные каналы в возбудимой мембране пространственно разобщены от той зоны мембраны, где происходит активный перенос  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ .

Как мы уже отмечали, активный перенос  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  сопряжен друг с другом благодаря единой ферментной системе, с которой связан активный насос. В условиях эксперимента можно добиться разобщения активных потоков  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  (наличие так называемого обмена  $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$  и  $\text{K}^+ - \text{K}^+$ ; см. рис. 14). Известно, что оптимум рН для Na,K-АТФ-азы составляет 7,4. Однако при рН 5,3—5,6 фермент проявляет свойства K-АТФ-азы, которая, возможно, регулирует активный обмен  $\text{K}^+ - \text{H}^+$ , а при рН 8,4—8,8 фермент проявляет свойства убаиннечувствительной Na-АТФ-азы, регулирующей обмен  $\text{Na}^+ - \text{Na}^+$  (Л. Г. Цакадзе, З. П. Кометиани, 1971). До сих пор не ясна роль Mg-АТФ-азы клеточных мембран и ее взаимосвязь с Na,K-АТФ-азой. В опытах на эритроцитах и микросомах почек показано, что Mg-АТФ-аза гидролизует внеклеточную АТФ, а Na,K-АТФ-аза — только внутриклеточную АТФ. Не является ли Mg-АТФ-аза «остовом» Na,K-АТФ-азы, обеспечивающей механические конформационные изменения в ходе работы Na,K-насоса (Б. А. Ташмухамедов, А. И. Гагельганс, 1973)? Однако в высокоочищенных препаратах Na,K-АТФ-азы активность Mg-АТФ-азы практически отсутствует. Для объяснения переноса  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  некоторые авторы (З. П. Кометиани, 1973) в качестве движущей силы привлекают окислительные процессы в клеточных мембранах: наличие системы дыхательной цепи, пространственное разделение  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$  по обе стороны мембраны.

В эритроцитах и саркоплазматической сети сравнительно хорошо изучена Ca-активируемая Mg-зависимая АТФ-аза, т. е. Ca-АТФ-аза, с которой связан активный транспорт  $\text{Ca}^{++}$  против градиента концентрации. Для этой транспортной Ca-АТФ-азы характерны следующие свойства: многостадийность реакции, образование макроэргического фосфорилированного продукта обмена, липопротендная природа, нечувствительность к убаину и олигомицину. На 1 моль АТФ переносится 1—2 моля  $\text{Ca}^{++}$ . Предполагают, что Na,K- и Ca-насосы осуществляются разными ферментными системами (Schatzmann, 1974). В нервной ткани активный транспорт  $\text{Ca}^{++}$  изучен еще недостаточно.

Аккумуляция меченых  $\text{Ca}^{++}$  в синапсомы и микросомы зависит от наличия в среде  $\text{Mg}^{++}$  и АТФ. Обнаружено (Lust, Robinson, 1970), что в синаптических структурах максимальным поглощением  $^{45}\text{Ca}$  (зависимого от АТФ и  $\text{Mg}^{++}$ ) обладают синаптические митохондрии, причем аккумуляция чувствительна к олигомицину: обратный процесс высвобождения Ca из митохондрий происходит при увеличении концентрации  $\text{Na}^+$  в среде, эффект последнего не тормозится убаином и пара-хлормеркурибензоатом, но тормозится ДНФ. Связывание  $\text{Ca}^{++}$  синаптическими мембранами мозга крыс зависит от температуры и АТФ, однако синаптические мембраны в отличие от синаптических митохондрий и микросом способны связывать  $\text{Ca}^{++}$  при очень низких концентрациях, кроме того, кофеин в присутствии АТФ угнетает связывание  $\text{Ca}^{++}$  только в синаптических мембранах (Saito et al., 1972). В этой же лаборатории обнаружено (Ichida, Yoshida, 1974), что  $\text{K}^+$  (100 мМ) активируют АТФ-зависимое связывание  $\text{Ca}^{++}$  синаптическими мембранами, а  $\text{Na}^+$ , особенно в присутствии KCl, подавляют связывание, вызывая высвобождение  $\text{Ca}^{++}$  из мембран. Этот эффект  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  слабо проявляется в микросомах мозга и совсем не проявляется при АТФ-зависимом связывании  $\text{Ca}^{++}$  митохондриями. Данные АТФ-зависимого транспорта  $\text{Ca}^{++}$  в микросомные везикулы можно объяснить механизмом активного Ca-насоса. Активное поступление  $\text{Ca}^{++}$  в синапсомы труднее объяснить, так как данный процесс может протекать как раз в обратном направлении — из синапсом в среду. По-видимому, присутствие микросомных загрязнений или обрывков синаптических мембран во фракции синапсом объясняет возможность обнаружения АТФ-зависимого поглощения  $\text{Ca}^{++}$ . Показано (Goddard, Robinson, 1976), что АТФ стимулирует поглощение  $\text{Ca}^{++}$  лишь митохондриями мозга, но не очищенными синапсомами. Деполяризующее воздействие (глутамат, KCl, убаин) увеличивает пассивное поглощение  $^{45}\text{Ca}$  и  $^{22}\text{Na}$  синапсомами, и этот эффект устраняется тетродотоксином и дифенилгидантоином. Убаин или замена  $[\text{Na}^+]_o$  холином способствует медленному высво-

бождению  $\text{Ca}^{++}$  из синапсом. Микроионофоретическими исследованиями на гигантском аксоне кальмара установлено, что выход  $\text{Ca}^{++}$  из аксона в среду контролируется внутриклеточной АТФ и зависит от  $[\text{Na}^+]_i$  (Dipolo, 1974).

Активность транспортной Са-АТФ-азы обнаруживается в микросомах и в синаптических мембранах мозга животных (С. А. Кудинов, Е. М. Макагоненко, 1973). С этим ферментом связан активный транспорт  $\text{Ca}^{++}$  из терминалей и тела нейронов в среду. Отметим некоторые свойства этого фермента: 1) локализация в клеточных (и синаптических) мембранах и отсутствие в СП и митохондриях мозга; 2) гидролиз АТФ в присутствии  $\text{Mg}^{++}$  ускоряется низкими концентрациями  $\text{Ca}^{++}$  ( $\sim 10^{-5}$  М); 3) отличие по своим свойствам и функции от миозинподобной АТФ-азы; 4) обработка детергентами (0,08% раствор дигитонина) солибилизирует фермент и повышает его активность; 5) тиоловые агенты, анестетики и  $\text{La}^{+++}$  ингибируют активность фермента (С. А. Кудинов и др., 1975; Roufogalis, 1974).

## ЧАСТЬ II. СПЕЦИФИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

### 7. Квантово-везикулярная теория секреции медиаторов

---

#### СИНАПТИЧЕСКИЕ ПУЗЫРЬКИ И ХРАНЕНИЕ МЕДИАТОРОВ

Синаптические пузырьки выполняют функции хранения (депонирования) основного запаса медиаторов в нервных окончаниях, формирования квантов передатчика, аккумуляции медиаторов из цитозоля терминалей. В некоторых случаях в СП происходит синтез медиатора. Кроме того, СП принимают важное участие в механизме экзоцитоза.

Синаптические пузырьки впервые были идентифицированы как специфические везикулярные органеллы терминалей de Robertis в 1955 г. Он же первый предположил участие СП в хранении и секреции медиаторов (de Robertis, 1958). Иногда удается наблюдать слипание некоторых СП с пре-СМ в области активной зоны синапсов и слипание «цитоплазмы» СП с просветом синаптической щели (см. Д. Н. Ленков, 1972). Именно наличием слипшихся, контактирующих СП можно объяснить захват материала внеклеточного пространства (опыты с пероксидазой, меченым альбумином и радиоактивной окисью тория — торотрастом). Форма и размеры популяции СП в индивидуальном нервном окончании достаточно постоянны, но варьиру-

ют в различных синапсах с той или иной медиаторной специфичностью.

По форме различают: 1) светлые сферондные агранулярные СП диаметром 30—50 нм, содержащие ацетилхолин и аминокислоты; 2) малые гранулярные СП диаметром 50—60 нм, содержащие такие медиаторы, как норадреналин, дофамин, серотонин и гистамин; 3) крупные гранулярные сферондные везикулы диаметром 100—200 нм, содержащие такие медиаторы, как пептиды, АТФ и катехоламины (в надпочечниках). Содержимое светлых СП несколько осмиофильнее, чем окружающая цитоплазма терминалей. Мелкие гранулярные СП, как правило, имеют в центре уплотнение диаметром 28 нм. Аналогичный признак отмечается и у крупных гранулярных СП. Для светлых и малых гранулярных СП отмечается локализация в терминалях некоторых количеств так называемых сложных, или «комплексных», СП, диаметр которых больше диаметра обычных СП. Эти «комплексные» СП чаще всего удалены от активной зоны синапса, имеют сложную оболочку (иногда окаймлены обрывками нейрофиламентов) и, вероятно, представляют собой резервные структуры, в которых происходят аккумуляция и синтез медиаторов (в частности, норадреналина). Отметим, что большое количество СП встречается лишь в окончаниях аксонов (и дендритов), концентрация их в аксонах невелика; еще меньше их в теле нейронов, где наибольшее число СП находится в области контакта соматической мембраны с аксоном или дендритом других нейронов. Распределение СП в синапсах не случайно: наибольшее количество этих структур (иногда в форме скоплений) отмечается в активной зоне.

Uchizono (1965), Vodian (1966) обнаружили, что светлые, уплощенные СП могут содержать тормозящие медиаторы (ГАМК или глицин), а светлые сферические СП — возбуждающие медиаторы. В связи с этим существует гипотеза, что каждому типу медиатора соответствует своя морфологическая разновидность СП. Однако в последующих работах (Д. А. Сахаров, 1975) было показано, что наличие так называемых уплощенных светлых СП в тех или иных терминалях зависит от способа фиксации ткани и, видимо, является артефактом. Как правило, светлые СП с тормозящими медиаторами имеют несколько меньшие размеры, чем светлые холинергические. Наличие определенного фонда светлых СП наряду с гранулярными в адренергических терминалях связано, вероятно, с опустошением запасов медиаторов как при функциональной активности, так и в процессе выделения и фиксации.

Происхождение СП полностью не установлено. Считалось, что СП образуются в результате отшнуровывания от пре-СМ при пиноцитозе, от мембран митохондрий, микротрубочек. Этому противоречит различие химического состава (белки, липиды, ферменты и т. д.) цитоплазматических волокон, митохондрий

и синаптических мембран. В настоящее время общепризнана точка зрения, что СП (особенно адренергические) образуются в теле нейрона — цистернах пластинчатого комплекса и затем с аксотоком мигрируют в терминали, где и происходит депонирование медиаторов. Большой период полуобновления белков СП, различие химического состава СП и пре-СМ, длительная сохранность СП в дегенерирующем нервном окончании указывают на многократность использования СП в синаптических процессах. Основываясь на фактах довольно быстрого обмена дофамин- $\beta$ -гидроксилазы в СП селезеночного нерва собаки ( $\tau_{50} = 26$  ч), de Potter, Chubb (1971) сделали вывод, что адренергические СП «разрушаются» после выделения норадреналина. По данным других авторов (Geffen, Livett, 1971),  $\tau_{50}$  для норадреналина адренергических СП составляет 30—100 дней.

Возникновение скоплений СП в нервно-мышечных синапсах (Atwood et al., 1969), синаптосомах и изолированной фракции СП мозга обезьян (Jones, 1970), связанных между собой нейрофиламентами, вблизи активной зоны признается не всеми (Д. Н. Ленков, 1972).

Во фракции СП обнаружены Mg-АТФ-аза, тиаминфосфатпирофосфорилаза. Результаты электрокинетических исследований показали (McLaughlin et al., 1973), что внешние мембраны СП мозга животных заряжены отрицательно ( $pK \sim 3,0-4,0$ ), причем этот заряд определяется не карбоксильными группами гликолипидов и глюкозаминогликанов. Гораздо большее значение в нейтрализации заряда мембран СП имеют  $Ca^{++}$ , чем  $Mg^{++}$ . Электрофоретическая подвижность СП коры мозга морской свинки в изотоническом растворе NaCl при pH 7,2 существенно больше таковой для синаптосом, митохондрий мозга и эритроцитов.

#### АТФ-аза СИНАПТИЧЕСКИХ ПУЗЫРЬКОВ

Исследования свойств АТФ-азы синаптических пузырьков важны в связи с контрактильной природой секреции медиаторов. В очищенных фракциях СП мозга животных и электрического органа ската Na,K-АТФ-аза отсутствует. Hosié (1965), исследуя СП переднего мозга и новой коры морских свинок, показал, что активность Mg-АТФ-азы выше, чем Ca-АТФ-азы<sup>1</sup>, причем  $Ca^{++}$  не активируют Mg-АТФ-азу. Одновременно было показано (Gegmain, Proulx, 1965), что АТФ-аза СП мозга крыс имеет одинаковый оптимум концентраций для  $Mg^{++}$  и  $Ca^{++}$  (1—2 мМ), причем активность Mg-АТФ-азы больше, чем Ca-АТФ-азы. Последнее свойство АТФ-аз отмечено также для очищен-

<sup>1</sup> Об активности Ca-АТФ-азы судили по скорости гидролиза АТФ в присутствии только  $Ca^{++}$ .



ных фракций СП коры мозга крыс, мозга морских свинок и электрического органа ската (Nagy et al., 1976). Показано, что  $\text{Ca}^{++}$  ингибируют Mg-АТФ-азу, а отношение Mg-АТФ-аза/ацетилхолин в холинергических СП очень низкое. Азид Na и ДНФ не влияют на активность Mg-АТФ-азы СП (Kadota et al., 1967). В этом авторы усматривают отличие Mg-АТФ-азы СП от таковой в митохондриях и микросомах мозга.

Снижение активности Mg-АТФ-азы называют ЭДТА, тиоловые яды, фосфолипаза С, 0,6 М KCl или NaCl. ЭДТА снимает эффекты высокой ионной силы, однако этим свойством обладает и Mg-АТФ-аза микросом мозга. Наоборот, в присутствии 0,1 М KCl или NaCl активность Mg-АТФ-азы фракции СП увеличивается. В СП этот фермент нечувствителен к олигомицину и атрактилату. Таким образом, АТФ-аза СП отличается по своим свойствам от АТФ-азы митохондрий мозга. По другим данным (Fogarty, 1971), Mg-АТФ-аза СП нечувствительна к N-этилмаленимиду и диизопропилфторфосфату. При исследовании свойств АТФ-аз фракции СП коры мозга быка показано (Н. К. Харченко, С. А. Кудинов, 1974), что СП не обладают Ca-активируемой, Mg-зависимой АТФ-азной активностью. АТФ-азы мембран СП обеспечивают везикулярный захват и секрецию медиаторов. Важную роль в регуляции АТФ-азы мембран СП играют  $\text{Mg}^{++}$  и  $\text{Ca}^{++}$ .

#### КВАНТОВЫЙ МЕХАНИЗМ СЕКРЕЦИИ МЕДИАТОРОВ

Квантовая гипотеза секреции медиаторов сформулирована в 1950—1952 гг. (Катц, 1968). В основу гипотезы были положены факты, полученные при микрофизиологическом изучении секреции ацетилхолина нервно-мышечными синапсами позвоночных, а впоследствии морфологические и биохимические данные о СП как месте хранения медиаторов в нервных окончаниях.

Секреция медиаторов может происходить двумя путями — либо путем экзоцитоза, т. е. выделения передатчиков в синаптическую щель при контакте СП с соответствующими участками пре-СМ, либо путем выделения свободного невезикулярного передатчика. В последнем случае допускается, что фонд секретруемого медиатора при возбуждении нервных окончаний может пополняться из СП (без контакта с пре-СМ). В литературе имеются достаточно убедительные доказательства секреции медиаторов путем экзоцитоза.

В состоянии покоя в нервных окончаниях происходит спонтанная секреция медиаторов за счет случайных столкновений СП с пре-СМ. Секретруемый медиатор реагирует с рецептором пост-СМ и возникает миниатюрный постсинаптический потенциал. Так, в нервно-мышечных синапсах позвоночных и беспозвоночных (для скелетных и гладких мышц) миниатюрные по-

тенциалы возникают спонтанно, беспорядочно, но эти аперiodические потенциалы очень малы, намного ниже порога возбуждения пост-СМ, и исчезают после перерезки нерва и последующей его дегенерации. Установлено, что миниатюрный потенциал вызывается определенной порцией (квантами) медиаторов. Их образование не связано с постоянной молекулярной утечкой медиаторов из терминали. Распределение числа квантов медиатора, освобождающихся в ответ на импульс, т. е. при деполяризации терминалей, или в условиях экспериментального угнетения секреции, происходит скачкообразно и подчиняется биномиальной статистике (Wegning, 1975). При вызванной секреции величина скачков и амплитуда постсинаптического потенциала (потенциал концевой пластинки для нервно-мышечных синапсов) имеют дискретный характер. Постоянное минимальное изменение амплитуды приблизительно равно значению амплитуды миниатюрного потенциала. Отсюда сделан вывод, что величина квантов при спонтанной и вызванной секреции медиаторов не меняется, при стимуляции терминалей изменяется лишь вероятность выделения количества квантов медиаторов. Постоянство количества квантов медиаторов свидетельствует о том, что механизм секреции скорее всего имеет характер экзоцитоза, чем диффузии свободного медиатора через пре-СМ. Квантовый состав медиатора определяется отношением величины амплитуды постсинаптического потенциала к среднему значению миниатюрного потенциала. По этой величине можно судить об эффективности синаптической передачи, по частоте миниатюрного потенциала — о состоянии секреторного процесса (количество квантов, скорость секреции). Количество квантов при деполяризации нервных окончаний резко увеличивается (в 100—300 раз). Амплитуда миниатюрного потенциала, указывающая на изменение величины квантов, зависит от скорости обратного захвата медиаторов и холина, скорости ресинтеза медиаторов в терминали и процесса депонирования в СП. Кванты освобождаются независимо друг от друга. Исследования различных синапсов показали, что секреция передатчика квантами является универсальным свойством химических синапсов (Купо, 1971).

Постоянство квантов при спонтанной и вызванной секреции медиаторов указывает на общность молекулярных механизмов секреции и на единый фонд медиаторов в нервном окончании в покое и возбуждении. В обоих случаях секретруется везикулярный медиатор. Высвобождение ацетилхолина в покое является сложным процессом: наблюдаются по крайней мере 3 типа биохимических реакций, о чем свидетельствуют данные о наличии 3 изломов на кривой Аррениуса, демонстрирующей зависимость логарифма частоты миниатюрного потенциала от обратной абсолютной температуры. Однако между вызванной и спонтанной секрецией медиаторов существует не только коли-

качественная, но и качественная разница. Она состоит в том, что вызванная секреция — это не простое и мгновенное ускорение спонтанного выделения квантов, кроме того, существует заметная синаптическая задержка между приходом импульса в нервное окончание и выбросом квантов передатчика. Синаптическая задержка — это минимальное время от прихода импульса в терминаль до действия медиатора на пост-СМ, которое состоит из времени освобождения медиатора из СП в ходе экзоцитоза ( $\tau_1$ ), диффузии медиатора через синаптическую щель ( $\tau_2$ ) и взаимодействия с рецептором и образования постсинаптического потенциала ( $\tau_3$ ). Для мотонейронов спинного мозга синаптическая задержка составляет 0,5 мс,  $\tau_2$  — 0,05 мс. Даже отдельные молекулы медиаторов могут оказывать измеримое действие на пост-СМ, т. е. постсинаптическая электрическая реакция не обладает дискретным характером.

Размер кванта довольно постоянен, но может уменьшаться, например при нарушении синтеза медиаторов. При спонтанной активности нервно-мышечных синапсов секретруется  $10^3$ — $10^5$ , а при вызванной —  $5 \cdot 10^6$ — $5 \cdot 10^8$  молекул ацетилхолина (Ginsborg, 1973). Анализ данных литературы показывает (табл. 6), что один квант медиатора соответствует содержимому пузырька или равен количеству молекул передатчика, кратному содержанию в 1 СП. Как показывают расчеты (см. табл. 6), изоосмотическая концентрация ацетилхолина в СП составляет 0,11—0,15 мМ, а величина кванта ацетилхолина колеблется в диапазоне  $4 \cdot 10^2$ — $4 \cdot 10^4$  молекул медиатора. В квантовой форме секретуются медиаторы лишь теми СП, которые находятся вблизи активной зоны синапсов (см. главу 10). Число готовых к секреции СП определяется количеством комплементарных участков пре-СМ, способных взаимодействовать с СП. Количество таких участков в нервно-мышечных синапсах может достигать 300—2000 (Hubbard, 1973). Из общего числа квантов в нервном окончании нервно-мышечных синапсов к секреции готов 1% их, а в ганглиях — 20%. В нервно-мышечных синапсах одиночный импульс вызывает секрецию приблизительно 20—500 квантов по  $10^5$ — $10^7$  молекул ацетилхолина, и эта избыточная секреция физиологически необходима. Одиночная терминаль в ганглии секретует на 1 импульс всего 1—3 кванта, что недостаточно для возбуждения постганглионарной клетки. Однако иннервация ганглия является множественной, что обеспечивает секрецию  $7 \cdot 10^3$  молекул ацетилхолина (Krnjević, 1974). При снижении ТМП в аксонах нервно-мышечных синапсов на каждые 10 мВ частота миниатюрного потенциала возрастает в 10 раз. При деполяризации терминалей на 90 мВ в момент прихода к ним импульса вероятность секреции квантов ацетилхолина увеличивается в 1 000 000 раз, достигая порядка 0,1—0,5. Это приводит к мгновенному высвобождению большого количества квантов ацетилхолина. Квантовый выход медиатора в ответ на

Квантовый состав медиаторов

Т а б л и ц а 6

Объект	Параметры	Авторы
Кора мозга морской свинки	Концентрация ацетилхолина во фракции синапсом 0,1 М, во фракции СП — 0,15 М. При учете частоты (10—14%) локализации холинергических нейронов в одном СП содержится $2,3 \cdot 10^3$ молекул ацетилхолина. При учете объема в одном СП может содержаться $4,5 \cdot 10^4$ молекул	Whittaker, 1965
Двигательные аксоны кошек, нервно-мышечный препарат	В одном СП содержится 400 молекул ацетилхолина, т. е. 0,11 М	Birks, 1966
Нервно-мышечный препарат	В одном СП содержится 900 молекул ацетилхолина	McIntosh, 1959
Диафрагма	Величина кванта составляет $4,5 \cdot 10^5$ молекул ацетилхолина	Krnjevic, Mitchell, 1961
Нервно-мышечный препарат	Величина кванта составляет $1 \cdot 10^4$ молекул ацетилхолина. Однако эта величина предполагает наличие кристаллической формы ацетилхолина в СП диаметром 40—50 нм, что маловероятно (Whittaker, 1970)	Катц, 1968
Электрический орган ската	В одном СП содержится $4 \cdot 10^4$ молекул, что соответствует изосмотической концентрации ацетилхолина в СП диаметром 75 нм	Whittaker, 1970
Нервно-мышечный препарат крыс, лягушек	В одном СП содержится $10^5$ — $10^6$ молекул ацетилхолина. Общее число квантов равно $5 \cdot 10^5$ — $3 \cdot 10^6$	Ginsborg, 1973
То же	Величина кванта составляет $5 \cdot 10^4$ молекул ацетилхолина	Elmqvist, Quastel, 1965
Периферические адренергические волокна	В одном СП содержится $1,2$ — $1,5 \cdot 10^4$ молекул норадреналина	Von Euler, 1969
То же	Величина кванта составляет 400 молекул норадреналина	Folkow, Haggendal, 1970
Кора мозга крыс	В одной терминали содержится $3 \cdot 10^4$ СП	Armstrong, Johnson, 1970
Грудная кожная мышца лягушки	Величина кванта составляет $10^4$ молекул ацетилхолина, концентрация его в синаптической щели 0,3 мМ	Kuffler, Yoshikami, 1975

1 импульс равен произведению числа СП, готовых к секреции, на вероятность освобождения медиатора.

Квантовая гипотеза секреции медиаторов объясняет многие физиологические процессы, такие, как эффекты облегчения (2-й импульс приходится на период остаточной деполяризации в течение 1 мс после 1-го импульса), депрессии (одиночный импульс вызывает подавление последующего) и посттетанической потенциации.

Установлено, что нервный импульс, достигая нервных окончаний и снижая ТМП, вызывает секрецию медиатора. Любой тип деполяризации (раздражение электрическим током, КС1 и другие агенты) «запускает» процесс секреции, зависимый от длительности деполяризации и степени снижения ТМП. Фактором сопряжения деполяризации и секреции медиаторов является увеличение пассивного поступления  $Ca^{++}$  внутрь нервного окончания. В опытах на аксоне кальмара с использованием внутриклеточно введенного флюоресцентного белка-маркера (экворин), реагирующего со свободным  $Ca^{++}$ , показана хорошая корреляция между уровнем деполяризации, секреции медиаторов и концентрацией накопленного в терминали  $Ca^{++}$  (Katz, Miledi, 1970). Зависимость от  $Ca^{++}$  является универсальной характеристикой любого активного секреторного процесса как медиаторов, так и гормонов (Rubin, 1970; Rasmussen, 1970). Спонтанная и вызванная секреции одинаково зависят от наличия  $Ca^{++}$  в инкубационной среде. Если  $Ca^{++}$  проходят в терминаль по Na-каналу, то блокаторы проводимости  $Na^{+}$  (анестетики, тетродотоксин) нарушают как спонтанную, так и вызванную секрецию. Если  $Ca^{++}$  при деполяризации определенных нервных окончаний переносятся по Ca-каналу, то при помощи тетродотоксина можно разобщить деполяризацию от секреции. Секрецию медиаторов можно нарушить блокаторами Ca-канала либо потенцировать при действии специфических Ca-ионофоров. В бескальциевой среде (удаление  $Ca^{++}$  из внеклеточной жидкости при добавлении ЭДТА) секреция может быть сразу же восстановлена, если к терминали в момент ее деполяризации путем ионофореза подвести  $Ca^{++}$ . Если подведение  $Ca^{++}$  осуществлять с задержкой, то восстановления секреции не наблюдается. Поступление  $Ca^{++}$  внутрь нервного окончания необходимо, с одной стороны, для «запуска» аппарата секреции, а с другой — для возникновения регенераторного тока  $K^{+}$  в процессе деполяризации (см. главу 6). Искусственное введение  $Ca^{++}$  внутрь аксонов кальмара резко усиливает спонтанную секрецию. Скорость секреции увеличивается при возрастании  $[Ca^{++}]_o$  от 0,5 до 10 мМ, при высоких значениях  $[Ca^{++}]_o$  возбудимость аксона и секреция блокируются. Увеличение  $[Mg^{++}]_o$  от 1 до 10 мМ также вызывает блок секреции медиаторов, при высоких концентрациях  $[Mg^{++}]_o$ , равных 10—16 мМ, наблюдается полный блок вызванной секреции, хотя спонтанная секреция не на-

рушается. Для вызванного освобождения одного кванта медиатора в нервно-мышечных синапсах требуется кооперативное участие трех или четырех  $\text{Ca}^{++}$ . Скорость спонтанной секреции в покое зависит от уровня поляризации пре-СМ и величины  $[\text{Ca}^{++}]_i$  внутри нервного окончания. При возбуждении скорость секреции определяется прежде всего двумя факторами: скоростью «открытия» Са-каналов (т. е. скоростью поступления  $\text{Ca}^{++}$  в терминаль) и количеством «открытых» комплементарных участков пре-СМ, способных контактировать с СП. Гиперполяризация терминали приводит к снижению скорости секреции медиаторов.

Секреторный процесс может состоять из 5 этапов: 1) поступления  $\text{Ca}^{++}$  в терминаль и активация комплементарных участков пре-СМ; 2) движение (мобилизация) СП к пре-СМ благодаря электростатическим силам либо путем химического взаимодействия; 3) взаимодействие СП с пре-СМ; 4) открытие пор в пре-СМ, через которые медиатор выбрасывается в синаптическую щель; 5) отделение СП от пре-СМ.

При деполяризующем воздействии (стимуляция электрическим током или  $\text{KCl}$ ) на срезы мозга (С. Г. Малошевский и др., 1975), на изолированный электрический орган ската (Zimmerman, Whittaker, 1974), на препарат верхнего шейного ганглия (Birks, 1974), нервно-мышечный синапс (Heuser et al., 1974) выявляются, как правило, следующие изменения ультраструктуры: набухание терминалей, снижение количества СП и их диаметра (особенно вблизи активной зоны синапсов), увеличение активной зоны. В последнем случае на срезах спинного мозга многи отмечено увеличение в пре-СМ числа зон прикрепления СП — конических выступов внутрь терминалей диаметром 20 нм, иногда с кратероподобным отверстием на вершине (Pfeppinger, Rovainen, 1974). Степень обнаруженных ультраструктурных изменений коррелирует с интенсивностью секреторного процесса, что является доказательством квантово-везикулярной природы секреции медиаторов.

Процесс секреции медиаторов регулируется биологически активными веществами, в том числе и самими медиаторами. Модулирующее действие медиаторов (и гормонов) на процесс секреции (табл. 7) нервными окончаниями каких-либо медиаторов (и гормонов) опосредовано через соответствующие аксональные рецепторы. Эти рецепторы могут быть внесинаптическими (т. е. без иннервации соответствующими нервными окончаниями) либо синаптическими (по принципу пресинаптического возбуждения или торможения). Антагонисты аксональных рецепторов снимают модулирующее действие. Модулирующий эффект проявляется либо при действии только медиаторов (и их миметиков), либо на фоне раздражения низкочастотным электрическим током изолированных нервов, ганглиев и т. д. В механизме модуляции важная роль принадлежит циклическим

Медиаторы (и гормоны) как модуляторы секреции  
(по материалам Г. Н. Крыжановского и др., 1974; Hubbard, 1973; Vizi, 1974)

Объект	Модулятор	Тип рецептора (в скобках указана локализация)	Увеличение (+) или уменьшение (-) секре- ции медиатора нервным окончанием
Холинергические нерв- но-мышечные синапсы позвоночных	Ацетилхолин	Н-холинорецептор (в области пере- хвата узла)	Ацетилхолин (+)
Холинергическая ин- нервация гладких мышц	»	М-холинорецептор (аксон)	» (-)
Холинергическая ин- нервация скелетных мышц	Норадреналин, адреналин	$\alpha$ -Адренорецептор (аксон) $\beta$ -Адренорецептор (пост-СМ)	» (+) » (-)
Холинергическая ин- нервация гладких мышц	То же	$\alpha$ -Адренорецептор (аксон)	» (-)
Холинергическая ин- нервация вегетатив- ных ганглиев	» »	$\alpha$ -Адренорецептор (аксон)	» (-)
Адренергические периферические нервы	Ацетилхолин	Н-холинорецептор (аксон) М-холинорецептор (аксон)	Норадреналин (+) » (-)
	Норадреналин	$\alpha$ -Адренорецептор (аксон)	» (-)
	Дофамин	—	» (-)
	Ацетилхолин	Н-холинорецептор (аксон)	Ацетилхолин (+)
Преганглионарные нервы	Ацетилхолин	Н-холинорецептор (аксон)	Ацетилхолин (+)
Надпочечники	Ацетилхолин, серотонин	Н-холинорецептор (Аксон)	Катехоламины (+) Норадреналин (+)
Селезеночный нерв, ткань сердца	Серотонин	—	Глутамат (+)
Ствол мозга живот- ных	Серотонин	—	Глутамат (+)
Головной мозг живот- ных (подбугорная об- ласть)	ГАМК	(Аксон) Пресинаптическое торможение или возбуждение	Серотонин (-), норадреналин (+)
То же	Дофамин	(Аксон)	Дофамин (-)
Нервно-мышечные си- напсы ракообразных	Ацетилхолин	М-холинорецептор (аксон)	ГАМК (-)
Вегетативные ганглии животных	Серотонин, ги- стамин, корти- костероиды	—	Ацетилхолин (+)
Кора головного мозга животных	Ацетилхолин	М-холинорецептор (аксон)	» (-)
	М-холинолитик	М-холинорецептор (аксон)	» (+)
Ткань мозга	Морфинподоб- ные пептиды	—	» (-) Дофамин (-)

Т а б л и ц а 8

Механизмы пре- и постсинаптического действия некоторых нейротоксинов  
(по материалам Р. Н. Глебова, Г. Н. Крыжановского, 1976; von Nahn,  
Hoppeger, 1974)

Нейротоксины	Действие
<p><math>\beta</math>-Бунгаротоксин (яд змей — полосатый аспид из семейства гадюк)</p>	<p>Полипептид (отн. мол. м. <math>21,8 \cdot 10^3</math>, димер). Первоначально вызывает в центральных и периферических синапсах <math>Ca</math>-независимое увеличение спонтанной секреции медиаторов, а затем в нервно-мышечных синапсах блокирует секрецию ацетилхолина, опосредствуя уменьшению количества СП до полного их исчезновения. Блокирует накопление <math>Ca</math> синаптическими митохондриями, вызывая высвобождение разобщителя окислительного фосфорилирования (жирные кислоты) из пре-СМ в цитозоль терминалей. Не идентичен фосфолипазе А, но обладает подобным действием</p>
<p>Батрахотоксин (яд кожных выделений колумбийской древесной лягушки)</p>	<p>Независимо от изменений <math>[Ca^{++}]_o</math> полностью устраняет быструю и медленную проницаемость для <math>Na^+</math> и резко повышает чувствительность к деполяризации, активируя «ворота» <math>Na</math>-канала. Конкурирует с новокаином за рецептор связывания с мембраной. Эффекты устраняются после обработки мембраны тиоловыми реагентами или тетродотоксином. Пресинаптические эффекты сходны с таковыми <math>\beta</math>-бунгаротоксина</p>
<p>Титьютоксин (яд скорпиона)</p>	<p>Деполаризующий эффект сходен с аналогичным <math>\beta</math>-бунгаротоксина, однако увеличение <math>[Ca^{++}]_o</math> устраняет эффекты этого яда. Повышает спонтанную <math>Ca</math>- и <math>Na</math>-зависимую секрецию ацетилхолина и норадреналина синапсосомами мозга. Увеличение пассивного транспорта <math>Ca^{++}</math> и <math>Na^{++}</math> снимается тетродотоксином. Структуру синапсов не разрушает</p>
<p>Нотетоксин (яд из желез австралийской тигровой змеи)</p>	<p>Полипептид (отн. мол. м. <math>13,5 \cdot 10^3</math>). Необратимо блокирует секрецию в нервно-мышечных синапсах, не изменяя проводимости нерва</p>
<p>«Черная вдова» (яд из желез самки паука каракурта)</p>	<p>Первоначально увеличивает спонтанную и вызванную секрецию ацетилхолина и глутамата в нервно-мышечных синапсах, а затем полностью блокирует синаптическую передачу. В этих условиях происходит разрушение пре-СМ и части СП</p>
<p>Столбнячный токсин (продукт клостридий)</p>	<p>Белок (отн. мол. м. <math>14 \cdot 10^4</math>, димер). Связывается с гликолипидами пре-СМ. Избирательно нарушает секрецию медиаторов в центральных и периферических синапсах, возможно, путем инактивации системы сократительных белков терминалей</p>



Нейротоксины	Действие
Ботулинический токсин (продукт клостридий)	Белок (отн. мол. м. $12 \cdot 10^4$ ). Связывается с гликолипидами пре-СМ, нарушая секрецию медиаторов в периферических синапсах
$\alpha$ -Бунгаротоксин	Необратимо связывается с N-холинорецептором мышц, как и D-тубокурарин. Аналогичное действие (хотя и обратимое) оказывает $\alpha$ -нейротоксин (токсин T <sub>3</sub> ) из яда кобры

нуклеотидам и простагландинам (см. главу 9). Для холин-, норадреналин- и дофаминергических нейронов установлена саморегуляция секреции по типу отрицательной обратной связи, т. е. нервные окончания «чувствуют» изменение концентрации медиатора в синаптической щели и «регулируют» собственную секреторную активность. Для изучения механизмов сопряжения деполяризации и секреции, а также постсинаптических процессов в настоящее время с успехом используют нейротоксины (чаще всего белковой природы), обладающие избирательным действием на нервные окончания или пост-СМ (табл. 8).

Остановимся еще на двух интересных факторах, влияющих на секреторный процесс: 1) действию разобщителей окислительного фосфорилирования и 2) действию блокаторов SH-групп белков. Повышение концентрации  $Ca^{++}$  в терминалях при возбуждении может приводить, помимо участия  $Ca^{++}$  непосредственно в секреторном акте, к активации его поглощения синаптическими митохондриями. Вследствие этого в терминали накапливаются значительные количества АТФ, которая может расходоваться как для обеспечения секреции и реполяризации, так и для процессов биосинтеза. По-видимому, более важным для «запуска» секреции является наличие достаточной концентрации свободного Са, чем резкое увеличение содержания АТФ. Об этом свидетельствуют факты, что разобщители окислительного фосфорилирования (2,4-ДНФ, жирные кислоты, азид Na и др.) вызывают увеличение спонтанной секреции ацетилхолина нервно-мышечными синапсами (И. М. Глаголева и др., 1970) и секреции  $^3H$ -ГАМК синапсосомами коры мозга крыс (Wernicke et al., 1975). Эффект разобщителей может быть связан с увеличением выхода Са из синаптических митохондрий в цитоплазму. Низкие концентрации блокаторов SH-групп белков ( $HgCl_2$ , пара-хлормеркурибензоат, N-этилмалеимид) усиливают спонтанную секрецию ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах скелетных и гладких мышц (Paton et al., 1971), медиаторных аминокислот в синапсосомах головного и спинного мозга, при этом

окислители SH-групп тормозят вызванную секрецию медиаторов. Принято считать (Kosower, Wergman, 1971), что при деполяризации происходит образование S—S-групп в возбудимых мембранах, а при реполяризации вновь образуются активные SH-группы белков.

### СЕКРЕЦИЯ «СПУТНИКОВ» МЕДИАТОРОВ

Медиаторы, в частности ацетилхолин и норадреналин, могут находиться в СП в виде комплекса с АТФ и кислыми полипептидами (см. главы 10, 11). При деполяризации нервных окончаний эти компоненты секретируются вместе с медиаторами в синаптическую щель, т. е. они являются своеобразными спутниками медиаторов. Эти данные наиболее демонстративно указывают на то, что процесс секреции имеет механизм экзоцитоза. Судьба этих спутников в синаптической щели полностью не ясна.

**Секреция адениловых нуклеотидов.** При стимуляции электрическим током периферических нервов лягушки (Е. А. Либерман и др., 1965) было замечено накопление в инкубационной среде неорганического фосфата, причем убаин препятствовал этому эффекту. В первое время эти факты не получили убедительных объяснений. При стимуляции электрическим током (2—7 Гц; 0,3—25 мин) нервно-мышечного препарата крыс (диафрагма с грудобрюшным нервом, тщательно отпрепарированная от мышц) Silinsky (1975) показал Ca-зависимую секрецию ацетилхолина и АТФ, а также АДФ, вероятно, за счет гидролиза АТФ в синаптической щели. Согласно его расчетам, концентрация АТФ в щели может достичь 0,08 мМ. Тубокурарин не снимает эффекта, что указывает на пресинаптический характер высвобождения АТФ. Стимуляция электрическим током грудобрюшного нерва без терминалей не приводит к секреции АТФ и АДФ. После того как весь ацетилхолин выделился (стимуляция электрическим током на фоне действия гемихолина-3), дальнейшая стимуляция не вызывает высвобождения АТФ. Электрофизиологическими методами доказано, что адениловые производные (0,1—0,01 мМ), такие, как АТФ, АДФ, АМФ и аденозин (но не аденин, инозин и гуанозин), способны блокировать квантовую спонтанную и вызванную секрецию ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах (Ribeiro, Walker, 1975). Тормозящий эффект АТФ на секрецию ацетилхолина не зависит от его способности связывать внеклеточные  $Ca^{++}$ . Предполагается, что АТФ и аденозин способны угнетать чрезмерную секрецию ацетилхолина в синаптической щели. При стимуляции электрическим током препарата верхнего шейного ганглия не наблюдалось высвобождения АТФ в среду (Kato et al., 1974). При инкубации нервно-мышечных препаратов кишечно-желуд-

дочного тракта с меченым аденозином и последующей их стимуляции электрическим током обнаружена секреция адениловых производных адренергическими и так называемыми тормозящими пуринергическими нервами. Гуанетидин блокирует секрецию норадреналина и АТФ только в адренергических нервах (Su et al., 1971). При стимуляции электрическим током изолированных надпочечников быка или при действии ацетилхолина секретируются катехоламины, АТФ и растворимые белки в количестве, пропорциональном числу импульсов (Poisner, 1970), при этом высвобождение АТФ блокируется ингибиторами синтеза АТФ. Однако в этом случае не наблюдается секреции АТФ селезеночными нервами кошки (Stjorne et al., 1970), возможно, потому, что содержание АТФ в хромаффинных гранулах значительно больше, чем в СП этого нерва.

Радиоавтографически обнаружено высвобождение меченых адениловых производных при стимуляции электрическим током *in situ* из аксонов нейронов морского конька крыс при спонтанной активности нейронов мозга (Schubert et al., 1976). При стимуляции электрическим током (20—50 Гц, 1—10 мин) срезов или синапсом новой коры мозга морской свинки показано (Kugoda, McIlwain, 1974) тетродотоксинчувствительное накопление в инкубационной среде меченых адениловых производных (в основном аденозина). В этих опытах Са-зависимая секреция адениловых производных наблюдается как в случае стимуляции электрическим током, так и при калиевой деполяризации. После прекращения деполяризующего воздействия происходит частично обратный захват аденозина синапсом. В работах McIlwain (1974) показано, что аденозин (0,01—0,1 мМ) потенцирует спонтанное (в 3—4 раза) и вызванное (в 10 раз) выделение адениловых производных из срезов мозга, что не согласуется с данными об угнетении аденозином чрезмерной секреции ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах. Возможно, эти факты указывают на специфику регуляции секреции в центральных и периферических синапсах. Из медиаторов лишь глутамат (0,5—5 мМ) и в меньшей степени гистамин (0,1 мМ) вызывали секрецию адениловых производных срезами мозга. Согласно этим данным, наблюдаемая вызванная секреция адениловых производных (по-видимому, АТФ) происходит в пресинаптической области. Обнаружение аденозина и других производных в инкубационной среде объясняется разрушением внеклеточной АТФ. По мнению Shimizu и соавт. (1973), при различных деполяризующих воздействиях секреция меченых адениловых производных срезами коры мозга морских свинок характерна для пуринергических нервных окончаний (см. главу 14). В нашей лаборатории выявлена также Са-зависимая секреция эндогенной АТФ при стимуляции электрическим током или деполяризации синапсом убаином. Секретируемая нервными окончаниями АТФ (и продукты ее распада) способна влиять на регулятор-

ную субъединицу аденилатциклазы пост-СМ (см. главу 9) и тем самым регулировать постсинаптические процессы.

**Секреция белков — спутников норадреналина и ацетилхолина.** Разные адренергические нервные окончания (селезенка, семявыносящие протоки, надпочечники) при различных деполярирующих воздействиях способны секретировать не только норадреналин, но и другие компоненты пузырьков — хромогранин А и дофамин- $\beta$ -гидроксилазу (Douglas, Poisner, 1966; Wooten et al., 1975). Отметим некоторые важные закономерности данного процесса. Секреция спутников, как и норадреналина, имеет Са-зависимый характер. Цитозольные ферменты терминалей, с которыми связан обмен катехоламинов, не секретятся. Высвобождение дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, а также норадреналина и хромогранина происходит из больших гранулярных СП. Резерпин способствует выбросу норадреналина, но не спутников, т. е. в этом случае высвобождается цитозольный медиатор. Секреция всех компонентов адренергическими нервами не зависит от выбора деполярирующих агентов. Наблюдается пропорциональная секреция норадреналина и белков-спутников, при этом показано снижение содержания медиатора в СП. Синаптическими пузырьками секретится лишь растворимая форма дофамин- $\beta$ -гидроксилазы.  $\alpha$ -Адренолитики пресинаптического действия увеличивают секрецию белков в семявыносящих протоках после стимуляции электрическим током, но не вызывают ее без стимуляции нерва. Если при калиевой деполяризации селезеночного нерва наблюдается секреция норадреналина и дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, то при снижении  $[Na^+]_o$  отмечается выделение лишь норадреналина, но не фермента, что указывает на нефизиологическую его секрецию (Garcia, Kigreka, 1975). Секреция дофамин- $\beta$ -гидроксилазы может зависеть от интенсивности деполярирующего воздействия: при умеренной стимуляции выброс норадреналина гораздо больше, чем белка, при интенсивной стимуляции происходит усиление выброса как медиатора, так и белка (Dixon et al., 1975). Кокаин потенцирует вызванную секрецию норадреналина, но блокирует секрецию фермента селезеночным нервом;  $\alpha$ -адренолитик феноксифензамин и цАМФ потенцируют вызванную секрецию норадреналина и белка (Subeddu et al., 1975). На секрецию белков нервными окончаниями указывают факты трансинаптической передачи белков с аксотоком (см. главу 9). При стимуляции электрическим током холинергических нервно-мышечных синапсов мышц наряду с выбросом ацетилхолина наблюдается и секреция водорастворимых кислых белков, возможно, везикулина (Hubbard, 1971). В результате стимуляции электрического органа ската в выделенных затем холинергических СП содержание ацетилхолина, АТФ и кислых белков синхронно уменьшается (Zimmerman, Whittaker, 1974). Эти данные указывают на возможность секреции спутников ацетилхолина.

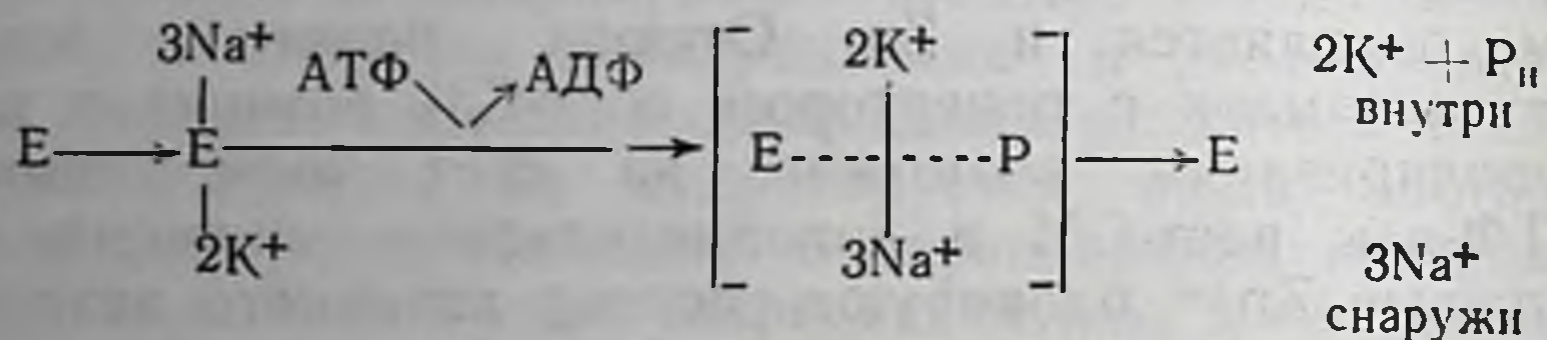
**Секреция спутников глутаминовой кислоты.** Получены важные данные о механизме депонирования и секреции глутамата (В. И. Кузнецов, 1976). Митохондриальный фермент синтеза глутамина — глутаминаза — является  $Zn$ -регулируемым ферментом, требующим в качестве кофактора восстановленного НАД·Н. Уровень окисления в глутаматергических синапсосоматических волокон морского конька понижен, так как присутствующий в синапсосомах  $Zn$  тормозит окисление в синаптических митохондриях и поддерживает высокий уровень НАД·Н, необходимого для синтеза глутамата. Глутаматергические СП морского конька (диаметр 40 нм), которые часто образуют мультивезикулярные агрегаты диаметром 200—400 нм, а также СП нервно-мышечных синапсов ракообразных и насекомых содержат  $Zn$ , который способствует депонированию в них глутамата. Другими словами, связанная форма глутамата в терминалях может быть в виде комплекса с  $Zn$ . Известны факты, что при стимуляции морского конька в синаптической щели вместе с глутаматом появляется и  $Zn$ . Отсюда понятно, что при реакции глутамата с рецептором пост-СМ возникает длительная деполяризация, возможно, за счет торможения  $Zn^{++}$   $Na, K$ -АТФ-азы пост-СМ и дополнительного снижения ТМП. Внеклеточные  $Zn^{++}$  блокируют систему активного захвата глутамата в терминали и тем самым способствуют постсинаптической потенциации, а также могут снижать величину ТМП нервных окончаний за счет торможения  $Na, K$ -АТФ-азы и тем самым облегчать секрецию глутамата и, кроме того, снимать ТПСР (также за счет торможения  $Na, K$ -АТФ-азы). Понятно, что при длительной стимуляции глутаматергических терминалей могут провоцироваться судороги, которые в данном случае снимаются дифенилгидантоином.

Увеличение фонда свободного  $Zn$  в терминали при деполяризации способствует торможению окисления НАД в синаптических митохондриях и тем самым стимулирует синтез глутамата, который связывает часть свободного  $Zn$ , при этом исходное состояние мембран терминалей восстанавливается. После субклеточного фракционирования ткани мозга не удается обнаружить преимущественной локализации глутамата в синапсосомах мозга. Поскольку концентрация глутамата в синапсосомах очень высока (в мозге концентрация глутамата до 10 мМ), то его достаточно, по мнению Kgnjevic (1971), для возбуждения пост-СМ.

#### УЧАСТИЕ $Na, K$ -АТФ-азы В МЕХАНИЗМЕ СОПРЯЖЕНИЯ ДЕПОЛЯРИЗАЦИИ И СЕКРЕЦИИ МЕДИАТОРОВ

Как мы отмечали, зона активного транспорта ионов пространственно отделена от зоны ионселективных каналов пассивного транспорта. Однако изменения активности  $Na, K$ -АТФ-азы, оп-

средованные фазовыми переходами в мембранах, могут определенным образом модулировать соответствующие сдвиги пассивного потока ионов. Скорость активного транспорта ионов во много раз больше скорости их пассивного потока. Предлагаемая некоторыми авторами (Post et al., 1967) гипотеза о едином переносчике в активном и пассивном транспорте ионов сейчас оспаривается. Однако Na,K-насос может поддерживать определенное соотношение между открытыми и закрытыми каналами в возбудимых мембранах. Выяснение этой взаимосвязи во многом зависит от построения молекулярной модели Na,K-насоса и роли липидов в работе Na,K-АТФ-азы. Ранее мы указывали на разнообразие толкований механизмов гидролиза АТФ Na,K-АТФ-азой. В последнее время многие исследователи отдают предпочтение модели Na,K-насоса с одновременным участием  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  в процессе гидролиза АТФ. Например, Whittam, Chipperfield (1975) предлагают следующую запись реакции:



Согласно этому, с одновременным переносом ионов легко представить обратимую Na,K-АТФ-азную реакцию, приводящую к синтезу АТФ. В этом случае насос работает в обратном направлении, т. е. переносит ионы по градиенту концентрации. Если предположить последовательный перенос ионов (путем нескольких частных реакций), реакция синтеза АТФ ассоциируется с «холостой» работой Na,K-насоса, т. е. в этом режиме Na,K-АТФ-аза катализирует синтез АТФ, но не переносит ионов. Переключение работы Na,K-АТФ-азы синаптических мембран либо на гидролиз АТФ и активный перенос ионов, либо на синтез АТФ может определяться сменой процессов покой — возбуждение. Здесь возможны два варианта. Первый вариант: при возбуждении нервных окончаний Na,K-насос активируется, например, при условии накопления внутриклеточных  $\text{Na}^+$ , т. е. увеличение пассивного потока ионов при возбуждении способствует активации работы насоса. Отсюда следует, что в покое и после проведения нервного импульса Na,K-насос переходит на менее активный режим работы. Второй вариант, который, на наш взгляд, более всего вероятен, заключается в том, что при возбуждении нервных окончаний Na,K-насос инактивируется, а после прекращения прохождения нервного импульса активность Na,K-насоса должна возрастать для химической перезарядки нерва после периода его активности, т. е. для восстановления ионного баланса и ТМП. Именно в этом случае наглядно проявляется участие электрогенной Na,K-АТФ-азы в образовании

ТМП. Согласно второму варианту, при возбуждении фаза инактивации Na,K-насоса предшествует и определяет интенсивность пассивного транспорта ионов. При максимальной Na-проводимости и усилении «запаздывающего» потока  $K^+$ , т. е. в фазу реполяризации, Na,K-АТФ-аза реактивируется, восстанавливая ТМП до нормы. Можно полагать, что при деполяризации терминалей в условиях инактивации Na,K-насоса последний работает в направлении синтеза АТФ и тем самым «подзаряжается» для обеспечения последующей реполяризации возбудимых мембран. Чтобы легче понять суть излагаемых нами представлений, мы сформулируем основные положения механизма сопряжения деполяризации и секреции медиаторов (Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский, 1975, 1976): а) при деполяризации аксональных мембран происходят структурные перестройки в мембранах, сопровождающиеся частичной (или полной) инактивацией Na,K-АТФ-азы и Na,K-насоса; б) фаза инактивации Na,K-АТФ-азы сопровождается затем фазой увеличения скорости пассивного потока  $Na^+$ ,  $K^+$  и  $Ca^{++}$  благодаря открытию ионселективных каналов; в) накопление  $Ca^{++}$  в терминалях индуцирует секрецию медиаторов. Из высказанных предположений следует выделить одно: секреция медиаторов нервными окончаниями протекает на фоне снижения активности Na,K-АТФ-азы аксональных мембран и пре-СМ.

В связи с этим рассмотрим состояние Na,K-АТФ-азы нервных окончаний в условиях секреции медиаторов.

Дефицит  $Na^+$  или избыток  $K^+$  в среде инкубации. Как правило, в этом случае  $Na^+$  в растворе Кребса—Рингера частично заменяли холинхлоридом или сахарозой. В этих условиях увеличивалось высвобождение эндогенного ацетилхолина из срезов мозга (Vizi, 1972) и нервно-мышечного препарата подвздошной кишки морской свинки (Paton et al., 1971). Paton и соавт. отмечали аналогичный эффект и при удалении  $K^+$  из инкубационной среды. Показано также увеличение высвобождения вновь синтезированного  $^{14}C$ -ацетилхолина из синапсом мозга крыс (Collier et al., 1972). При дефиците  $Na^+$  в инкубационной среде наблюдалось также Ca-зависимое высвобождение  $^3H$ -норадреналина из срезов сердца крыс и изолированного селезеночного нерва кошки (Garcia, Kigreka, 1973), увеличение выхода эндогенных норадреналина и ГАМК из срезов мозга в инкубационную среду, однако в этих условиях выход серотонина уменьшается (Н. А. Есаян, 1971). При инкубации синапсом мозга крыс при частичной замене  $Na^+$  холином наблюдается высвобождение  $^3H$ -ГАМК (Levi, Raiteri, 1974), при этом отсутствует гомологический обмен немеченой ГАМК в среде на меченую в осадке синапсом. Высвобождение эндогенных ГАМК и глутаминовой кислоты отмечено при инкубации синапсом продолговатого или спинного мозга крыс при дефиците  $Na^+$  (Osborne, Bradford, 1975).

Как при дефиците  $\text{Na}^+$ , так и при избытке  $\text{K}^+$  в инкубационной среде (от 5 до 50 мМ) активность  $\text{Na, K-ATP-азы}$  уменьшается. Об экзоцитозном характере секреции медиаторов в этом случае свидетельствует лишь зависимость процесса от  $\text{Ca}^{++}$ . Прямые экспериментальные данные о секреции медиаторов СП при калиевой деполяризации нервных окончаний немногочисленны.

**Убаин и секреция медиаторов.** Точка приложения убаина на наружной поверхности любых клеточных, в том числе нейрональных, мембран — это связывание с калиевым активным центром молекулы  $\text{Na, K-ATP-азы}$ . Убаин в концентрации  $10^{-3}$ — $10^{-5}$  М оказывает деполяризующее действие, уменьшая концентрацию  $\text{K}^+$  и увеличивая  $\text{Na}^+$  в ткани и модуляцию пассивного транспорта  $\text{Ca}^{++}$  внутрь возбудимых клеток. Последнее обстоятельство, важное для инициирования секреции, показано в опытах по связыванию  $^{45}\text{Ca}$  срезами коры мозга крыс (Pincus, Lee, 1973), синапсами мозга крыс (Swanson et al., 1974) и гигантскими аксонами кальмара (Baker et al., 1969). В последней работе отмечается, что при убаиновой деполяризации  $\text{Ca}^{++}$  транспортируются по  $\text{Na}$ -каналу. Действие убаина (0,1 мМ) на накопление  $\text{Ca}$  в срезах мозга крыс снимается путем снижения  $[\text{Na}^+]_o$  (Stahl, Swanson, 1972). Убаин, так же как и стимуляция электрическим током, оказывает  $\text{Ca}$ -зависимое увеличение интенсивности дыхания и обмена фосфопротеидов в срезах мозга морских свинок и, так же как калиевая деполяризация, увеличивает интенсивность дыхания в срезах мозга крыс. Эти данные указывают на то, что вход  $\text{Ca}^{++}$  в нервные клетки и терминали важен не только для секреции, но и для энергетических и синтетических процессов. Убедительные доказательства снижения потенциала мембран синапсом мозга крыс при действии убаина или калиевой деполяризации представлены Blaustein, Goldring (1975).

В последние годы появилось большое количество работ (табл. 9), свидетельствующих о стимуляции убаином секреции медиаторов нервно-мышечными синапсами, изолированными нервами, срезами мозга или синапсами мозга животных, а также гормонов железистыми клетками. В ряде опытов показана  $\text{Ca}$ -зависимая секреция при действии убаина. При вызванной стимуляции нервных окончаний убаин, как правило, может вначале ускорять, а при длительной экспозиции либо при больших дозах сразу уменьшать секрецию медиаторов, очевидно, вследствие торможения обратного захвата терминалями медиаторов и холина. Данные об уменьшении запасов медиаторов в СП при убаиновой деполяризации нервных окончаний в литературе отсутствуют.

**Торможение  $\text{Na, K-ATP-азы}$  при стимуляции электрическим током синапсом.** Стимуляция электрическим током синапсом приводит: к  $\text{Ca}$ -зависимой секреции различных медиаторов,



Влияние уабанна на секрецию медиаторов и гормонов *in vitro*

Объект	Действие	Авторы
Нервно-мышечный препарат лягушки	Усиление Са-зависимой спонтанной и значительное усиление вызванной стимуляцией током секреции ацетилхолина. При длительной инкубации уабанн блокирует синаптическую передачу, возможно, вследствие блока обратного захвата холина терминалями	Elmqvist, Feldman, 1965; Birks, Cohen, 1968
Нервно-мышечный препарат лягушки (седалищный нерв)	Са-зависимая секреция эндогенного ацетилхолина	Baker, Crawford, 1975
Нервно-мышечный препарат подвздошной кишки морской свинки	Секреция ацетилхолина (увеличение частоты миниатюрного потенциала)	Paton et al., 1971
Селезеночный нерв кошки	Секреция $^3\text{H}$ -норадреналина	Kirpekar et al., 1970
Сетчатка лягушки	Секреция $^3\text{H}$ -ГАМК	Kennedy, Voaden, 1974
Надпочечники быка	Са-зависимая секреция катехоламинов	Banks, 1967
Срезы сердца крыс	Секреция $^3\text{H}$ -норадреналина	Bogdansky, Brodie, 1969
Срезы мозга животных	Увеличение Са-зависимой секреции $^3\text{H}$ -норадреналина, вызванной 55 мМ КСI	Pincus, Lee, 1973
То же	Секреция $^3\text{H}$ -ацетилхолина	Vizi, 1972
» »	Секреция эндогенных ГАМК и глутамата. Аналогичный эффект оказывает ДНФ	Sklenovsky et al., 1967
» »	Секреция меченых адениловых производных	Shimizu et al., 1970
» »	Торможение секреции меченых норадреналина и серотонина, вызванной стимуляцией электрическим током	Katz, Kopin, 1969
» »	Са- и тетродотоксинонечувствительная секреция $^3\text{H}$ -ацетилхолина	Gomez et al., 1975
» »	Са-зависимое накопление цАМФ в ткани, объясняемое Са-зависимой секрецией медиаторов и их действием на пост-СМ	Huang, Daly, 1974

Объект	Действие	Авторы
Изолированный спинной мозг животных	Секреция $^3\text{H}$ -ГАМК. Торможение секреции ГАМК, вызванной стимуляцией электрическим током	Collins, 1974
Синаптосомы головного мозга животных	Секреция $^3\text{H}$ -ГАМК, не влияющая на высвобождение меченой 2-дезоксиглюкозы	Wernicke et al., 1975
Синаптосомы спинного и головного мозга крыс	Секреция эндогенных медиаторных аминокислот. Стимуляция электрическим током не усиливала действие убаина	de Bellerocche, Bradford, 1972

к снижению концентрации  $\text{K}^+$  и увеличению концентрации  $\text{Na}^+$  в синаптосомах, а также к увеличению связывания синаптосомами  $^{45}\text{Ca}$  (Swanson et al., 1974), к снижению величины ТМП синапсом (с  $-31$  до  $-7$  мВ), к увеличению диффузии СП и образованию их скоплений вблизи активной зоны пре-СМ при морфологической сохранности синапсом (Bradford, 1975).

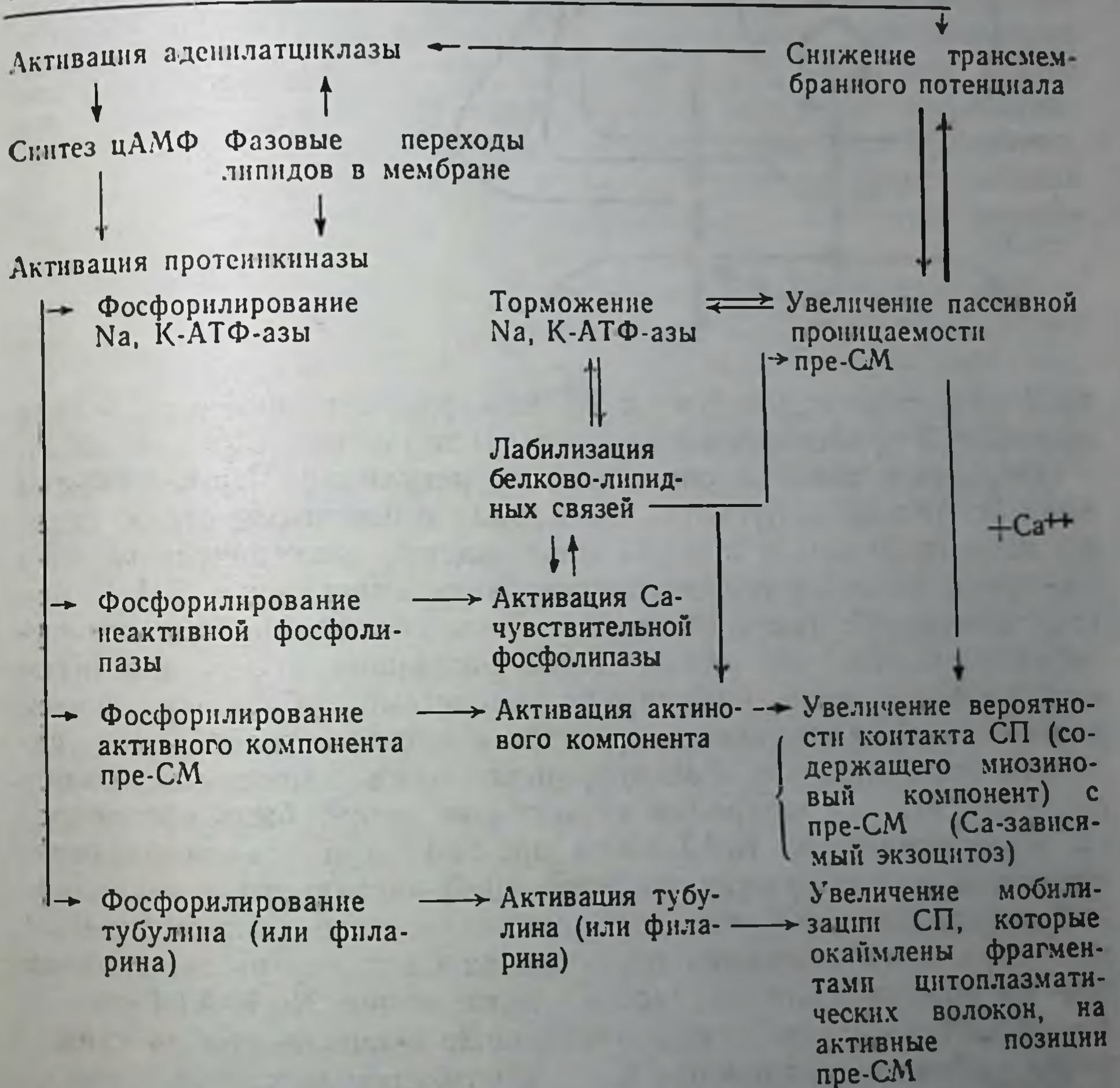
Наибольший интерес представляют данные, касающиеся изменений непосредственно в пре-СМ при деполяризации синапсом. Нами показано, что при стимуляции электрическим током суспензии синапсом наблюдается значительное торможение активности  $\text{Na, K-ATP-азы}$  (Р. Н. Глебов и др., 1974). Этот феномен показан нами также при стимуляции электрическим током суспензии нативных синаптических мембран коры мозга крыс (Р. Н. Глебов и др., 1976). Так, при стимуляции электрическим током синаптических мембран наблюдается  $\text{Ca}$ -зависимое торможение активности транспортных  $\text{Na, K-}$  и  $\text{Ca-ATP-аз}$ . Данный эффект, по-видимому, не вызван перекисным окислением липидов мембран или изменением содержания SH-групп в мембранных белках. Эффект устраняется добавлением в среду инкубации суммарных липидов мозга и новокаина. Эти данные являются доказательством того, что при деполяризации пре-СМ происходят структурные изменения. В этом отношении интересны данные о том, что стимуляция электрическим током синапсом вызывает  $\text{Ca}$ -зависимое увеличение интенсивности обмена фосфатидной кислоты в мембранах (Bleasdale, Hawthorne, 1975). Нами показано, что цАМФ в концентрации  $0,1-1,0$  мМ значительно (до 50%) тормозит активность  $\text{Na, K-ATP-азы}$  нативных синаптических мембран. Ни стимуляция электрическим током, ни цАМФ не вызывают изменений активности  $\text{Na, K-ATP-азы}$  очищенного мембранного препарата мозга быка, обладающего высокой активностью  $\text{Na, K-ATP-азы}$ . Эти факты позволяют считать, что аденилатциклаза или протеникиназа, при-

существующие во фракции нативных синаптических мембран, могут быть факторами, приводящими к торможению активности Na,K-АТФ-азы нервных окончаний при стимуляции электрическим током, т. е. при деполяризации (схема 4). Приведенную

### Схема 4

#### Метаболические процессы в пре-СМ при возбуждении нервных окончаний

Раздражитель (электрический ток)



схему подтверждают факты наличия аденилатциклазы и протеинкиназы не только в пост-СМ, но и в пре-СМ, модуляции цАМФ секреции медиаторов, транспорта  $Ca^{++}$  внутрь клеток (Rasmussen, 1970) и структурных перестроек в синаптических мембранах (С. В. Конев и др., 1975). Фосфорилирование белков синаптических мембран изменяет скорость обмена  $Ca^{++}$ , что может регулировать секрецию медиаторов. Проницаемость мем-

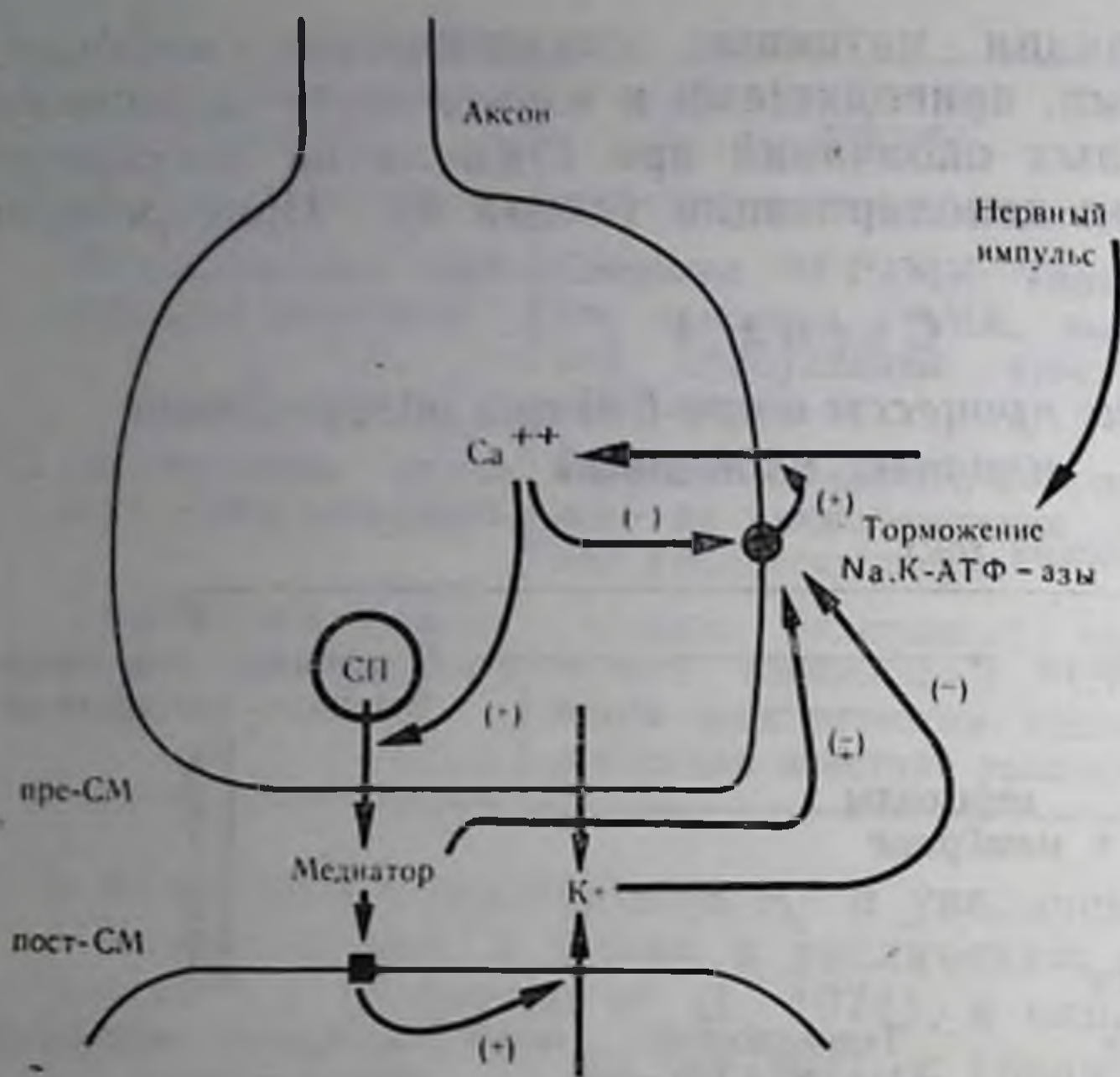


Рис. 16. Обратные связи в регуляции Na, K-АТФ-азы пре-СМ и секреции медиаторов. (+) и (-) обозначают соответственно ослабление или усиление активности Na, K-АТФ-азы.

бран синапсом для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$  при фосфорилировании белков: эндогенной протеинкиназой не меняется (Weller, Morgan, 1977).

Обратные связи в синапсах и регуляция Na,K-АТФ-азы пре-СМ. Можно допустить, что наряду с быстрыми структурными перестройками в пре-СМ прохождение электрического тока уже само по себе может инициировать уменьшение ТМП. Вся цепь изменений (рис. 16) может быть сбалансирована и регулироваться так, что любой деполяризующий агент, действующий на одно звено, инициирует по системе обратных связей первоначальное «пусковое» триггерное звено, которое далее усиливает весь процесс. Рассмотренные нами данные позволяют предполагать, что секреция медиаторов может быть обусловлена торможением Na,K-АТФ-азы пре-СМ при деполяризации; существование сопряженных изменений пассивного и активного транспорта катионов при деполяризации; что определяющим моментом для повышения поступления  $\text{Ca}^{++}$  внутрь терминалей при их возбуждении является торможение Na,K-АТФ-азы, о чем свидетельствуют также отмеченные выше опыты по стимуляции уабаином транспорта  $\text{Ca}^{++}$  в возбудимые клетки.

Регуляция функций Na,K-АТФ-азы пре-СМ (а возможно, и пост-СМ) при деполяризации может протекать по типу положительной обратной связи (см. рис. 16) либо внутриклеточными  $\text{Ca}^{++}$ , либо внеклеточным медиатором, либо внеклеточными  $\text{K}^+$ , накопившимися в синаптической щели при деполяризации пре- и пост-СМ. Все эти влияния способны усиливать торможение Na,K-АТФ-азы и тем самым еще более усиливать поток  $\text{Ca}^{++}$  внутрь терминалей и секрецию медиаторов. В этом может за-

ключаться один из механизмов повышения эффективности синаптической передачи.

В нормальных условиях структурные перестройки пре-СМ сбалансированы и обратимы при смене состояний покой — возбуждение, при конвергенции возбуждающих и тормозящих влияний. При судорогах структурно-функциональный сдвиг в синаптических мембранах может инициироваться в совокупности нейронов (например, в результате значительного повышения  $[K^+]_o$  мембраны соседних нейронов также деполяризуются), что и обеспечивает работу определенного фонда нейронов как генераторов патологически усиленного возбуждения (Г. Н. Крыжановский и др., 1975, 1976). На основании этого можно объяснить обнаруженные нами факты снижения активности Na,K-АТФ-азы мембран коры мозга крыс при судорогах, вызванных электрическим током, и увеличение в определенных структурах мозга активности Na,K-АТФ-азы в послесудорожный период (Г. Н. Крыжановский др., 1976).

Участие Na,K-АТФ-азы пре-СМ в обратном захвате медиаторов. После постсинаптического действия медиаторы и холин (в случае ацетилхолина) способны обратно захватываться терминалями при помощи высокоизбирательной системы транспорта через пре-СМ против градиента концентрации. Главной особенностью этой системы переноса медиаторов является сопряженность работы переносчика в пре-СМ и Na,K-АТФ-азы. Чем больше активность Na,K-АТФ-азы, тем выше эффективность высокоаффинной системы переноса медиаторов. При деполяризации нервных окончаний обратный захват медиаторов является минимальным или совсем выключенным и становится интенсивным после прекращения возбуждения, т. е. при восстановлении высокого уровня активности Na,K-АТФ-азы. При стимуляции электрическим током суспензии синапсом мозга мышей показано, что увеличивается лишь пассивное (но не активное) накопление меченых ГАМК, глутамата и таурина (Ländesmäki et al., 1975). То же самое показано при калиевой деполяризации срезов коры мозга крыс в отношении связывания  $^3H$ -холинхлорида (Molenaar et al., 1973).

#### ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ Na, K-АТФ-азы ПРИ ДЕ- И ГИПЕРПОЛЯРИЗАЦИИ ПОСТ-СМ

Основные принципы функционирования Na,K-АТФ-азы пост-СМ следующие: а) регуляция Na,K-АТФ-азы пре-СМ и пост-СМ различная; б) структурные изменения в химически возбудимой части пост-СМ при взаимодействии медиаторов с соответствующими рецепторами предопределяют (регулируют) состояние активности Na,K-АТФ-азы, которое в свою очередь определяет адекватные изменения мембранной проницаемости и образова-

ние либо ВПСП, либо ТПСП; в) при деполяризации пост-СМ Na,K-АТФ-аза может быть заторможена, а при гиперполяризации — активирована и функционирует в электрогенном режиме. Для поддержания концентрационного градиента Na,K-АТФ-аза создает дополнительную разность ТМП, т. е. его электрогенный компонент (20—30% от общего ТМП), который регулирует порог возбуждения. При устранении электрогенного компонента ТМП проведение возбуждения облегчается.

**Гиперполяризация пост-СМ и Na,K-АТФ-аза.** Существует ряд данных, указывающих на то, что при гиперполяризации может наблюдаться активация электрогенного Na,K-насоса (см. П. Г. Костюк, 1975; А. А. Болдырев, 1977).

Первые данные по этому вопросу получены при изучении феномена посттетанической гиперполяризации, заключающегося в том, что в ответ на вызванную трансинаптическую деполяризацию пост-СМ нервно-мышечных синапсов появляется также следовая гиперполяризация. При избытке  $K^+$  в инкубационной среде в препарате седалищного нерва лягушки следовый потенциал быстро исчезает. Уабайн или дефицит  $Na^+$  в инкубационной среде нервно-мышечных препаратов млекопитающих также снижали образование следового потенциала. На демиелинизированном нервно-мышечном препарате млекопитающих при действии уабайна, избытка  $K^+$  (или его дефицита в среде) также отмечено снятие эффекта посттетанической гиперполяризации. В этом случае амплитуда гиперполяризации находится в линейной зависимости от  $[K^+]_o$ . Активация электрогенного Na,K-насоса предполагается и при вышеописанном феномене в нейронах рецептора растяжения ракообразных. Строфантин снимает следовую гиперполяризацию, вызванную ионофоретическим введением глутамата в мультиполярные клетки спинного мозга мышей, однако эффект этого гликозида не проявляется в ганглиях заднего корешка спинного мозга (Ransom et al., 1975).

Вторая группа данных получена при искусственной гиперполяризации и повышении ТМП. Уабайн снимает повышение ТМП в портняжной мышце лягушки, выдержанной предварительно при  $2^\circ C$  (24 ч) при  $[K^+]_o = 0$  и затем перенесенной в среду, содержащую 10 мМ KCl при  $20^\circ C$ . Аналогичные данные были получены на гладких мышцах подвздошной кишки морской свинки. Строфантин K снимает положительный сдвиг потенциала при помещении препарата нейронов виноградной улитки из холодной среды в более теплую. Введение  $Na^+$  внутрь гигантских нейронов моллюсков путем микроионофореза вызывает повышение ТМП, сопровождающееся усилением выходящего тока Na против градиента концентрации. Уабайн снимает гиперполяризацию леммоцитов, вызванную резким увеличением  $[Ca^{++}]_o$  (Villegas et al., 1968).

Третья группа данных получена при изучении образования ТПСП, вызванного действием экзогенных медиаторов. Так,

введение дофамина или ацетилхолина вызывает гиперполяризацию в нейронах виноградной улитки или аплизии, которая снимается убаином. По данным Kerkut и соавт. (1969), ацетилхолин вызывает гиперполяризацию одних типов нейронов виноградной улитки, нечувствительную к убаину и изменению вне- и внутриклеточных  $Na^+$ , но подавляемую увеличением  $[Cl^-]_i$  или снижением  $[Cl^-]_o$ , и гиперполяризацию других типов нейронов, нечувствительную к изменению вне- и внутриклеточных  $Cl^-$ , но подавляемую убаином или увеличением  $[Na^+]_i$  или уменьшением  $[Na^+]_o$ . Действие адреналина на гладкие мышцы вызывает увеличение ТМП, сопровождающееся увеличением активного транспорта  $Na^+$  и снижением пассивного транспорта  $K^+$ . Показано также, что гиперполяризационный потенциал не меняется при изменении  $[K^+]_o$  в пределах 0—30 мМ.

Четвертая группа данных получена при регистрации ТПСП, вызванного транссинаптической передачей. В этом случае на нейронах моллюсков получены отрицательные данные: величина ТМП не связана непосредственно с повышением активного транспорта  $Na^+$ . На симпатическом ганглии амфибии показано, что убаин устраняет медленный ТПСП. При стимуляции электрическим током нерва краба отмечено увеличение активности суммарной  $Na, K, Mg$ -АТФ-азы, причем эффект зависел от частоты стимуляции (О. Р. Кольс и др., 1974). По-видимому, активация АТФ-азы связана с гиперполяризацией пост-СМ. Созданная различными способами гиперполяризация, по мнению Koketsu (1971), получает удовлетворительное объяснение на основе данных по активации электрогенного  $Na, K$ -насоса. Показано (Jagbrough, 1976), что убаин препятствует возникновению ТПСП при действии норадреналина или дофамина соответственно на грушевидные невроны или нейроны хвостатого ядра мозга. Однако убаин не оказывает антагонистического действия на указанные структуры при действии ГАМК. По данным Р. А. Копаладзе и др. (1976), торможение в коре головного мозга при аудиогенном судорожном припадке связано с увеличением активности суммарной АТФ-азы и содержания свободных радикалов, в то время как при деполяризационной инактивации нейронов (депрессия Леао) наблюдается снижение активности АТФ-азы и содержания свободных радикалов. Предполагается, что при де- и гиперполяризации нейронов различный характер перекисного окисления липидов мембран предопределяет характер изменения  $Na, K$ -АТФ-азы.

Гипотеза о роли системы циклических нуклеотидов в регуляции де- и гиперполяризации пост-СМ. Greengard (1973) высказал гипотезу о роли цАМФ в механизме транссинаптической передачи. Суть этой гипотезы заключается в том, что система цАМФ может регулировать изменения ТМП в пост-СМ. Последовательность процессов, несколько нами модифицированная, следующая: взаимодействие медиатора с рецептором пост-

СМ → активация АДЦ-азы (в случае ацетилхолина—гуанилатциклазы) → стимуляция цАМФ протеинкиназы → фосфорилирование либо Na,K-АТФ-азы, либо белков, непосредственно участвующих в изменении мембранной проницаемости, → изменение транспорта ионов → изменение ТМП → восстановление ТМП до исходного состояния мембранной протеинфосфатазой, катализирующей дефосфорилирование белков. Все указанные процессы могут быть сопряжены, взаиморегулируемы мультиферментным ансамблем с триггерным механизмом иницирования. Согласно этим представлениям, сами медиаторы или циклические нуклеотиды косвенно благодаря активации протеинкиназы могут регулировать состояние активности Na,K-АТФ-азы пост-СМ и изменение ТМП. Некоторые авторы допускают, что в нервно-мышечных синапсах (электрический орган ската) с возбуждающим действием ацетилхолина Н-холинорецептор и Na,K-АТФ-аза могут иметь сходные субъединицы (Rivas et al., 1972). Интересны данные А. А. Болдырева и сотр. (1975), которые указывают, что денервация скелетных мышц кроликов, сопровождающаяся, как известно, увеличением количества активных Н-холинорецепторов на поверхности мембран, приводит к увеличению чувствительности Na,K-АТФ-азы к тормозящему действию ацетилхолина, которое выражается, в частности, в снижении константы ингибирования. Однако в рамках этих представлений нельзя объяснить, почему ацетилхолин в опытах указанных авторов тормозит Na,K-АТФ-азу сарколеммы сердца кроликов, где медиатор является тормозящим (табл. 10).

На основании экспериментальных данных Torda (1974) предложила интересный механизм деполяризации пост-СМ, заключающийся в изменении обмена полиинозитидов в сторону образования ДФИ, при этом гиперполяризация сопровождается образованием ТФИ (см. главу 5). Образование ДФИ может приводить к высвобождению части мембранно-связанного Са (в виде комплекса с ТФИ), который далее тормозит Na,K-АТФ-азу и обеспечивает деполяризацию. Отметим, что гипотеза не предусматривала вовлечение в процесс Na,K-АТФ-азы. Образование ТФИ способствует превращению свободного Са в мембранно-связанную форму, тем самым, по нашим предположениям, создаются условия для активации Na,K-АТФ-азы, так как фермент освобождается от тормозящего влияния Са<sup>++</sup>. Взаимодействие медиаторов с рецептором может изменять состояние Na,K-АТФ-азы без прямого участия циклических нуклеотидов, однако роль последних может сводиться к восстановлению ТМП до исходного уровня.

Таким образом, активность Na,K-АТФ-азы пост-СМ может регулироваться либо фосфорилированием цАМФ-зависимой протеинкиназой, либо Са<sup>++</sup>. Не исключена также возможность и влияния активированной (при помощи протеинкиназы) фосфолипазы на Na,K-АТФ-азу (см. схему 4).



Таблица 10

Влияние медиаторов, гормонов и цАМФ на Na, K-АТФ-азу различных тканей *in vitro*

Ткань	Концентрация эффектора (M)	Действие на Na, K-АТФ-азу	Авторы
Бурая жировая	Норадреналин ( $10^{-4}$ — $10^{-7}$ )	(+) ( $\beta$ -адренорецепторы и частично $\alpha$ -адренорецепторы)	Horwitz, Eaton, 1975
	цАМФ ( $10^{-4}$ — $10^{-6}$ )		
Гладкие мышцы матки	Норадреналин, цАМФ	(+) ( $\beta$ -адренорецептор)	Limas et al., 1974
Слизистая оболочка желудка	Адреналин, гистамин, цАМФ	(—)	Moszik, 1969
	Ацетилхолин	(+) (M-холинорецептор)	
Корковый и мозговой слой почек	цАМФ, адреналин ( $10^{-4}$ — $10^{-6}$ )	(+)	О. Б. Кузьмин, П. А. Смирнов, 1974, 1975
	Норадреналин ( <i>in vivo</i> )	(+)	
Тромбоциты	Норадреналин ( $10^{-6}$ — $10^{-7}$ )	(+) ( $\alpha$ -адренорецептор)	Coffey et al., 1971
	цАМФ ( $10^{-4}$ — $10^{-7}$ )	(—)	
Печень	цАМФ, цГМФ, адреналин, глюкагон ( $5 \cdot 10^{-5}$ )	(—) ( $\beta$ -адренорецептор)	Tria et al., 1974
	Инсулин, цГМФ	(+) Эффект инсулина проявляется в присутствии адреналина или глюкагона	
Сердце	цАМФ ( $10^{-4}$ — $10^{-6}$ )	(—)	П. А. Смирнов, О. Б. Кузьмин, 1974
	Инсулин	(+)	
	Адреналин, цАМФ ( $10^{-4}$ — $10^{-6}$ )	(—) ( $\beta$ -адренорецептор)	Limas, 1973
	Ацетилхолин ( $10^{-6}$ )	(—) (M-холинорецептор)	Lee et al., 1963
	Ацетилхолин ( $10^{-2}$ — $10^{-4}$ )	(—) (M-холинорецептор); возможно влияние на транслокационную стадию	А. А. Болдырев и др., 1971

Ткань	Концентрация эффектора (М)	Действие на Na, K-АТФ-азу	Авторы
Скелетные мышцы	<ul style="list-style-type: none"> <li>цАМФ (<math>10^{-6}</math>—<math>10^{-8}</math>)</li> <li>Инсулин</li> <li>Ацетилхолин (<math>10^{-2}</math>—<math>10^{-4}</math>)</li> </ul>	Отсутствует (+) (—) (Н-холинорецептор)	Gavrusk et al., 1974 А. А. Болдырев, 1977
Целый мозг (синаптосомы, синаптические мембраны); кора мозга	Норадреналин ( $10^{-4}$ — $10^{-6}$ )	(+) ( $\alpha$ -адренорецептор)	Chappuis et al., 1975
Кора, мозг	<ul style="list-style-type: none"> <li>Норадреналин, серотонин (<math>5 \cdot 10^{-4}</math>)</li> <li>Гистамин, ГАМК (<math>5 \cdot 10^{-4}</math>)</li> <li>цАМФ (<math>10^{-4}</math>)</li> </ul>	(+), больше $10^{-3}$ М (—) (—), больше $10^{-3}$ М (+) (—), потенцирует тормозящий эффект норадреналина	З. П. Коментарни, Т. Я. Джарнашвили, 1975
Кора и другие отделы мозга	<ul style="list-style-type: none"> <li>Норадреналин, серотонин (<math>10^{-5}</math>—<math>10^{-7}</math>)</li> <li>Дофамин (<math>10^{-5}</math>—<math>10^{-7}</math>)</li> </ul>	(+), влияние на Mg-АТФ-азу отсутствует Не влияет	Logan, O'Donovan, 1975
Кора мозга	Ацетилхолин ( $2$ — $10 \cdot 10^{-3}$ )	(—), меньше $2 \cdot 10^{-3}$ М (+). ЭГТА снимает лишь тормозящий эффект, ацетилхолин действует на транслоказную стадию, не действует на микросомы печени, эритроциты	З. П. Коментарни и др., 1975
Кора мозга	<ul style="list-style-type: none"> <li>Норадреналин (<math>10^{-3}</math>—<math>5 \cdot 10^{-3}</math>)</li> <li>Ацетилхолин (<math>10^{-3}</math>—<math>10^{-5}</math>)</li> </ul>	(+) ( $\alpha$ -адренорецептор) (—)	Gilbert et al., 1975
Кора мозга, мозжечок, подбугорная область	<ul style="list-style-type: none"> <li>цАМФ (<math>5 \cdot 10^{-6}</math>—<math>5 \cdot 10^{-5}</math>)</li> <li>Норадреналин, серотонин, дофамин (<math>10^{-3}</math>—<math>10^{-4}</math>)</li> </ul>	Не влияет (+)	Yoshimura, 1973

Ткань	Концентрация эффектора (М)	Действие на Na, K-АТФ-азу	Авторы
Кора мозга	цАМФ	Эндогенное цАМФ-зависимое фосфорилирование протеникиназной каталитической субъединицы Na, K-АТФ-азы	Schwartz et al., 1975
Кора мозга	цАМФ ( $10^{-3}$ — $10^{-5}$ )	(—)	Р. Н. Глебов и др., 1975
	Ацетилхолин, норадреналин, ГАМК ( $10^{-2}$ — $10^{-4}$ )	(—)	Р. Н. Глебов, Н. М. Дмитриева, 1974; Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский, 1975
Целый мозг	Норадреналин ( $10^{-5}$ )	Уменьшает тормозящий эффект $Ca^{++}$	Wins, Dargent-Salee, 1971

Примечание. (+) и (—) означают увеличение или уменьшение активности Na, K-АТФ-азы. В скобках — рецептор, через который опосредован конечный эффект; в этом случае использовались соответствующие литические средства, которые снимают эффект медиатора.

Мы попытались сравнить данные о влиянии различных медиаторов и цАМФ на Na, K-АТФ-азу (Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский, 1975). Анализ данных табл. 10 позволяет сделать ряд важных обобщений.

Как видно из данных табл. 10, в опытах использовали высокие концентрации медиаторов. Необходимо учесть, что в момент возбуждения в некоторых участках пост-СМ могут наблюдаться высокие концентрации передатчиков, обеспечивающие надежность и эффективность синаптической передачи. Действие ацетилхолина и норадреналина специфично для Na, K-АТФ-азы и, как правило, не связано с изменением Mg-АТФ-азы. По-видимому, действие ацетилхолина на Na, K-АТФ-азу мышц и мозга обусловлено изменением транслоказной реакции. Действие медиаторов на Na, K-АТФ-азу не прямое, а опосредовано через соответствующие рецепторы пост-СМ, при этом литические средства снимают эффект медиаторов и их агонистов. Например, активирующий эффект норадреналина в гладких мышцах опосредован через  $\beta$ -адренорецепторы, а в мозге — через  $\alpha$ -адренорецепторы. Тормозящий эффект ацетилхолина в скелетных мышцах опосредован через Н-холинорецепторы, а активирующий эффект в слизистой оболочке желудка — через М-холинорецептор. Активацию Na, K-АТФ-азы синаптических мембран мозга животных З. П. Кометиани связывает с тормозящим дей-

ствием ацетилхолина, а снижение активности  $\text{Na, K-ATP-азы}$  — с возбуждающим действием этого медиатора на пост-СМ. Характер действия ацетилхолина зависит как от концентрации, так и от типа используемой фракции синаптических мембран. Обнаружена определенная корреляция действия норадреналина и цАМФ на  $\text{Na, K-ATP-азу}$ . В некоторых случаях эффект медиаторов связан с перераспределением свободного и связанного  $\text{Ca}$ , которое может зависеть от характера взаимодействия медиатора с рецептором пост-СМ. По-видимому, активация  $\text{Na, K-ATP-азы}$  мозга низкими концентрациями медиаторных аминокислот зависит от их способности связывать  $\text{Ca}^{++}$ , а торможение высокими концентрациями происходит за счет связывания  $\text{Mg}^{++}$  (Ting-Beall, Wells, 1971).

## 8. Сократительная природа секреции медиаторов

---

### НЕМЫШЕЧНЫЕ СОКРАТИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ И ИХ ФУНКЦИИ

Идея об универсальности сократительных белков в разнообразных двигательных функциях клеток высказана еще в 1940—1950 гг. Сократимость — важное свойство построенных из олигомеров белков реагировать значительными конформационными сдвигами в составе цитоплазматических волокон (чаще всего) на изменения химического состава среды, главным образом на изменения содержания ионов и АТФ. Сократительные белки являются важным функциональным элементом мембран клеток и субклеточных органелл. С сократительной системой АТФ—АТФ-аза — сократительный белок, ассоциированной с определенными структурами (микротрубочки, нейрофиламенты, фибриллярные волокна и т. д.), связаны различные двигательные функции живых организмов. Молекулярные формы движения могут быть разнообразными: продольное скольжение цитоплазматических нитей одной относительно другой, полимеризация сократительных белков, переходы глобула — фибриллярная форма, складывание или скручивание полипептидных цепей и т. д. Эндогенным регулятором в сократительной системе является, вероятно,  $Ca^{++}$ , хотя регуляция сокращения — расслабления в различных немы-

шечных сократительных системах может иметь специфику. В нервной ткани сократительные белки могут выполнять разнообразные функции: сокращение глиальных клеток и их отростков; участие в аксоптозе; участие в секреции медиаторов.

## ТУБУЛИН

Микротрубочки тела нейронов и аксоплазмы, а также нейрофиламенты содержат сократительные белки — тубулин и филарин соответственно (см. главу 2).

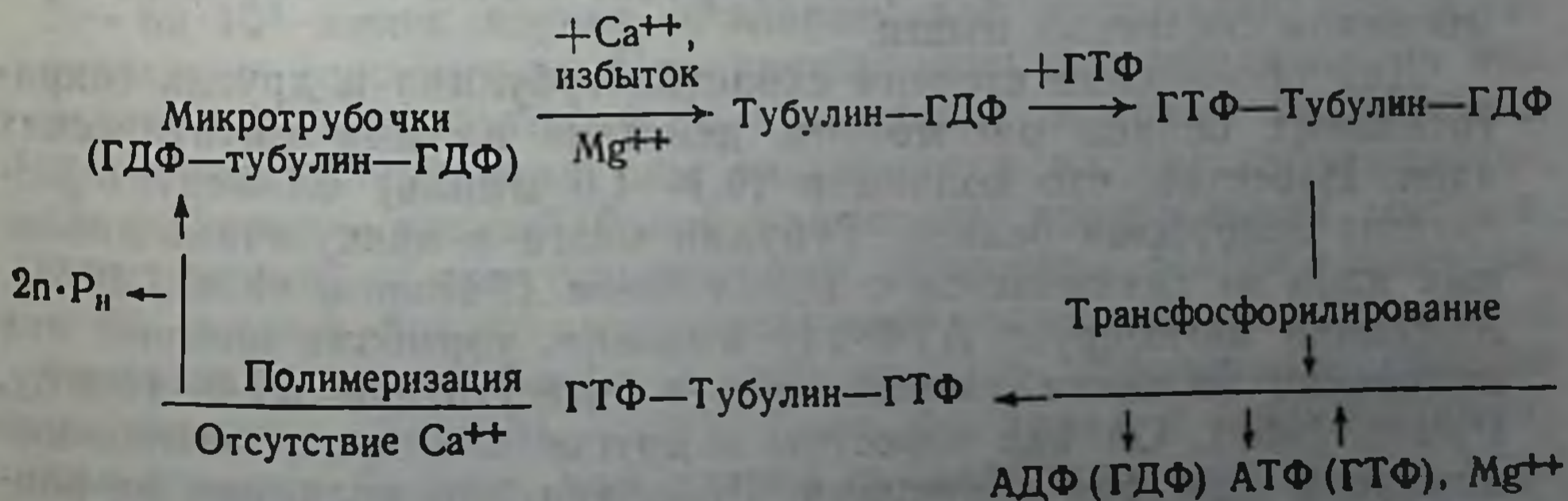
Морфологические реакции, кинетические свойства, чувствительность к митотическим ядам, температурная зависимость, реакции полимеризации тубулина *in vitro* подобны поведению лабильной системы микротрубочки — тубулин *in vivo* практически для всех клеток эукариотов, в том числе и в тканях мозга (Bogisy et al., 1974).

Тубулин мозга, как правило, выделяют из цитозольной фракции, полученной при температуре 0—4 °С. Далее проводят полимеризацию тубулина при 37 °С и в результате центрифугирования цитозоля при 37 °С осаждают микротрубочки, которые очищают последующей деполимеризацией при 0—4 °С и повторной полимеризацией. Доля тубулина среди белков мозга взрослых животных очень высока — до 10% (до 20% от состава растворимых белков).

Наибольшее количество тубулина выделяется из зрительного бугра и подбугорной области. Обратимая эндотермическая реакция образования микротрубочек из тубулина происходит при температуре 37 °С в присутствии ГТФ при рН 6,8—7,0. Процесс полимеризации тормозится (т. е. процесс деполимеризации ускоряется)  $\text{Ca}^{++}$  (0,5—1,0 мМ), в среде с высокой ионной силой (больше 150 мМ NaCl или KCl),  $\text{Mg}^{++}$  (больше 10—30 мМ); при рН > 7,6 или < 5,9, при снижении температуры до 0—15 °С, при увеличении давления. На 1 моль тубулина (отн. мол. м. димера  $11\text{—}12 \cdot 10^4$ ) необходимо 2 моля ГТФ, который *in vitro* может быть заменен АТФ. Полимеризацию тубулина в нервные трубочки блокируют также анестетики,  $\text{Cu}^{++}$ , тиоловые реагенты и митотические яды. Последние используют в качестве биологического теста участия микротрубочек в том или ином процессе. При действии колхицина ( $K_{\text{связ}} = 10^{-6}$  М) и особенно подофилотоксина ( $K_{\text{связ}} = 10^{-7}$  М) в системе динамического равновесия микротрубочки — тубулин в основном представлен тубулин. Колхицин не разрушает непосредственно структуры лабильных микротрубочек мозга, но сдвигает равновесие реакции в сторону образования тубулина. Таким образом, колхицин быстро и обратимо (независимо от температуры) связывает свободный тубулин (в отношении 1:1). Митотические яды вызывают преципитацию тубулина. Связывающие центры тубулина с колхицином (действие которого сходно с подофилотоксином), гризеофульвином и винбластином различны. Например, винбластин нарушает связь ГТФ, а также Ca или Mg с белком; индуцирует разрушение микротрубочек на субъединицы или фи-

ламенты, которые затем преобразуются в гексагонально упакованные кристаллы с  $K_s$ , равной 9 или 30S. По-видимому, винбластин действует как поликатион. Микротрубочки особенно устойчивы в тяжелой воде ( $D_2O$ ), что указывает на наличие гидрофобных связей между субъединицами. Синтез белков микротрубочек и нейрофиламентов происходит в теле нейрона. Соли алюминия или иминопропионитрил нарушают регуляцию синтеза, приводя к аномальной сверхпродукции этих белков.

Тубулин мозга представляет собой гетеродимер ( $\alpha_1\beta_1$ ), состоящий из двух протомеров: из  $\alpha$ - и  $\beta$ -тубулина с отн. мол. м.  $55-60 \cdot 10^3$ . Однако у них имеются небольшие различия в величинах отн. мол. м. и аминокислотной последовательности. Так, содержание серина больше в  $\beta$ -тубулине, чем в  $\alpha$ -тубулине. Расстояние между двумя протомерами в микротрубочке 8 нм. Значение  $t_{50}$  для протомеров одинаково и составляет 3,9 сут. Характерным свойством тубулина является отсутствие  $S-S$ -связей.  $\alpha$ -Тубулин в отличие от  $\beta$ -тубулина обладает ковалентной посттрансляционной модификацией: ферментативным присоединением некоторых аминокислот (тирозин, фенилаланин и ДОФА) по С-концу молекулы. Часть молекул тубулина находится в гликозилированной форме, т. е. тубулин, по-видимому, является гликопротеидом (Feit, Shelanski, 1975). Олигосахариды связаны с аминокислотами (N-ацетилгалактозамин и серин или треонин) ковалентной O-гликозидной связью. Предполагается (Вгуан, 1975), что фосфолипиды могут иметь значение при самосборке микротрубочек. Тубулин — кислый белок, так как содержит до 29% глутамата и аспартата, в его составе много пролина и глицина. По данным Jacobs (1975), 1 моль димера тубулина связан с 2 молями ГТФ (или, точнее, ГДФ). Микротрубочки — полярные структуры: при полимеризации в опытах *in vitro* тубулин надстраивает предобразованные фрагменты микротрубочек преимущественно с одного конца. Благодаря этому микротрубочки могут точно определять направление движения. При самосборке тубулина в микротрубочки происходит трансфосфорилирование по серину в  $\beta$ -субъединице (Eirreg, 1975), причем сам тубулин обладает ферментативной активностью. АТФ- или ГТФ-азной активностью тубулин не обладает. Процесс самосборки тубулина представляется следующим образом:



Возможно, что для полимеризации тубулина *in vitro* необходимы высокомолекулярные щелочные белки цитозоля (с отн. мол. м. больше 270 000). Тубулин мозга (Goodman et al., 1970) и белки нейросекреторных гранул (Labrie et al., 1971) способны фосфорилироваться экзогенной цАМФ-зависимой протеинкиназой. Таким образом, система цАМФ регулирует рост аксонов и самосборку нервных трубочек (Roisen, 1972). Более того, очищенный тубулин мозга свиньи обладает протеинкиназной активностью и способен фосфорилировать гистоны и собственные молекулы в присутствии цАМФ (Soifer et al., 1975). В этом случае тубулин как цАМФ-чувствительная протеинкиназа не фосфорилирует сократительные белки мышц и белки фракции СП мозга. Чувствительность фосфорилирования к цАМФ указывает не на реакцию сополимеризации тубулина с ГТФ (или АТФ), а на ферментативный процесс. Тубулин мозга крыс (Rappaport et al., 1975) обладает протеинкиназой активностью, умеренно стимулируемой цАМФ, причем свойства этого фермента отличны от свойств растворимой протеинкиназы цитозоля. Если обнаруженная активность протеинкиназы в препарате тубулина не является примесью, то можно говорить об открытии трансформации тубулина в определенный критический момент функционирования нейронов (аксона и нервных окончаний) в протеинкиназу, которая фосфорилирует собственные молекулы. Промежуточной формой образования микротрубочек мозга из тубулина с  $K_S=6S$  является олигомер с  $K_S=32S$ , имеющий вид двойного кольца (восьмерка) с внешним диаметром 40 нм (Weisenberg et al., 1968). Недавно обнаружена еще одна олигомерная форма при самосборке микротрубочек — одинарная кольцевая структура с  $K_S=20S$ , которая образуется при рН 6,5 из тубулина и преобразуется далее в олигомер с  $K_S=32-36S$  (Doenges et al., 1976).

В филогенетическом отношении тубулин и актин мышц различны. Актин синапсом мозга отличается от тубулина электрофоретической подвижностью, составом аминокислот (в частности, в тубулине отсутствует 5-метилгистидин). Тубулин и актин мышц различаются по относительной молекулярной массе, пептидным картам, типам связывания нуклеотидов (АТФ или ГТФ). Гомогенный препарат тубулина мозга не связывается с миозином скелетных мышц.

Для объяснения степени сходства тубулина и других сократительных белков рассмотрим действие на них митотических ядов. Известно, что колхицин (0,1—1,0 ммоль) блокирует SH-группы некоторых белков. Тубулин мозга в присутствии тиоловых ядов не связывается с колхицином (Solomon et al., 1973). Колхицин ингибирует АТФ-азу миозина, тормозит циклические изменения вязкости актомиозина в присутствии АТФ (Вагпу, Palais, 1952). Однако известны и другие данные, объясняющие механизм действия колхицина. Показано, что колхицин не вли-



яет на АТФ-азу миозина или актомиозина скелетных мышц, но ингибирует полимеризацию актина из глобулярной формы в фибриллярную (Forsheit, Hayashi, 1967). Авторы отмечают, что колхицин не деполимеризует уже готовый F-актин, но способен к деполимеризации актина веретена в делящейся клетке. Получены доказательства того, что актин неспособен связывать меченый колхицин (Davison, 1971). Колхицин и винбластин, а также цитохалазин В тормозят Mg-АТФ-азу селезеночного нерва кошки (Khan, Ochs, 1972) и актомиозинподобного белка синапсом мозга животных (Nicklas et al., 1973).

Микротрубочки аксоплазмы могут также давать поперечные филаментные ответвления — мостики, соединяющие эти трубочки между собой. Эти мостики диаметром 5—10 нм могут соединять микротрубочки с «текущими» по аксону структурами (СП, митохондрии, фрагменты цитоплазматической сети). Филаментозные ответвления микротрубочек содержат миозинподобный белок с отн. мол. м.  $34 \cdot 10^4$  (Murphy, Bogisy, 1975).

В главе 2 мы указывали, что цитоплазматические волокна «сползают» в нервных окончаниях с медленным аксотоком, где они деполимеризуются до мономеров или олигомеров, и способны встраиваться в пре-СМ (примембранный слой) и частично связываться с мембранами СП. Действительно, в синапсом обнаружен белок, связывающий  $^3\text{H}$ -колхицин и входящий в состав синаптических мембран, цитозоля и частично СП (Fait, Bagondes, 1970). При помощи электронной микроскопии установлено (Metuzals, Mushynski, 1974) наличие филаментозных структур вблизи пре-СМ. В растворимых белках синапсом содержание тубулина также высокое — до 21% (Mahler et al., 1975). Особенно много тубулина обнаружено во фракции синаптических контактов, причем, по иммуногистохимическим данным Hyden (1974), тубулин обнаруживается и в субсинаптической сети пост-СМ.

## ФИЛАРИН

Этот сократительный белок нейрофиламентов с отн. мол. м.  $57—69 \cdot 10^3$  менее изучен. Филарин, как и тубулин, содержит связанные нуклеотиды. При диссоциации нейрофиламентов под действием детергентов, 6 М гуанидина, тиоловых реагентов и при сукцинилировании они разделяются на две субъединицы: 1) филарин — кислый белок с высоким содержанием серина, участвующий в пространственном удлинении нейрофиламентов, и 2) кислый белок, аминокислотный состав которого сходен с таковым микротрубочек; с ним связано образование скелета филаментов (Schmitt, 1968). Доля филарина в нейрофиламентах гораздо больше, чем второй субъединицы. Пептидные карты белков нейрофиламентов и микротрубочек в целом идентич-

ны. Возможно, что филарин представляет собой один из протомеров тубулина (Johnson, Sinex, 1974). Колхицин и винбластин не разрушают структуры нейрофиламентов, из митотических ядов таким действием обладают лишь цитохалазины. Микротрубочки гораздо более чувствительны к  $\text{Ca}^{++}$ , чем нейрофиламенты.

#### АКТИН-, МИОЗИН-, ТРОПОНИН, ТРОПОМИОЗИНПОДОБНЫЕ БЕЛКИ НЕРВНЫХ ОКОНЧАНИЙ

Биохимические исследования последних лет выявили в нервных окончаниях практически полную систему сократительных белков и их регуляторов. В 1961 г. Б. Ф. Поглазов впервые обнаружил в ткани мозга миозинподобный белок. Большую серию работ по обнаружению в синапсах сократительных белков, подобных актомиозину скелетных мышц, опубликовали в 1970—1975 гг. Berg, Puzkin (см. Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский, 1975, 1976; Berg et al., 1973). Показано, что актомиозинподобный белок, или нейростенин мозга, выделяется в основном только из синапсом (8—10% по отношению к белкам этой фракции). Антитела к нейростенину, выделенному из целого мозга, реагируют только с фракцией синапсом.

Свойства нейростенина и его компонентов сходны со свойствами сократительных белков, выделенных из целого мозга. Относительная молекулярная масса актинподобного белка, или нейрина, синапсом равна  $45-47 \cdot 10^3$ , субъединиц миозинподобного белка, или стенина, по одним данным  $24 \cdot 10^4$  (Berg et al., 1973), по другим —  $20 \cdot 10^4$  и  $17 \cdot 10^4$  (Blitz, Fine, 1974). Аналогично мышечному актину нейрин мозга содержит необычную аминокислоту — 3-метилгистидин. Стенин мозга содержит, как и миозин, 3-метилгистидин и N-ε-метиллизин. В состав нейрина мозга входят связанные нуклеотиды (в отношении 1:1), которые обмениваются со свободной АТФ. Нейрин мозга сополимеризуется с АТФ в присутствии  $\text{Mg}^{++}$  в среде с низкой ионной силой. Нейрин, как и актин мышц, стимулирует  $\text{Mg}$ -АТФ-азу стенина мозга или миозина. Значение  $\tau_{50}$  для актина мозга крыс составляет 6 сут (Hemmilki, 1973). Гидролиз АТФ в присутствии нейростенина мозга, как и для актомиозина скелетных мышц, стимулируется в большей степени  $\text{Mg}^{++}$ , чем  $\text{Ca}^{++}$ , и максимален в среде с низкой ионной силой.  $\text{Mg}$ -АТФ-аза нейростенина тормозится тиоловыми реагентами. Относительная вязкость при смешивании нейрина со стенином, нейрина с миозинном, стенина с актином резко увеличивается. Образовавшийся комплекс при действии АТФ в среде с высокой ионной силой (0,6 М KCl) отвечает быстрым уменьшением вязкости, которая по мере гидролиза АТФ медленно достигает исходного уровня. Подобно актомиозину, нейростенин синапсом дает реакцию

суперпреципитации в присутствии  $Mg^{++}$  и АТФ, которая ингибируется тиоловыми ядами. Большие концентрации АТФ способны оказывать расслабляющий эффект, т. е. вызывать диссоциацию нейростенина на нейрин и стенин. В препарате нейростенина выявляется высокая активность аденилатдезаминазы — фермента, регулирующего фонд адениловых нуклеотидов, по-видимому, в СП (Weil-Malherbe, 1975). Нейростенин обладает высоким сродством к гликолипидам, цереброзиды способны тормозить Mg-АТФ-азу (Ю. Г. Сандалов и др., 1975). Учитывая связь сократительных белков с мембранами синаптических структур, можно полагать, что лабилизация белково-липидных связей пре-СМ при возбуждении терминалей может определять характер образования актомиозинового комплекса. Недавно показано, что кодирующие участки в молекуле мРНК, ответственные за синтез актина мозга или скелетных мышц, различаются между собой.

Из мозга эмбрионов цыпленка выделены тропомиозинподобный белок с отн. мол. м.  $29 \cdot 10^3$  (Blitz, Fine, 1974) и тропонинподобный белок с отн. мол. м.  $17 \cdot 10^4$  (Fine et al., 1975). В бескальциевой среде тропонин мозга блокирует Mg-АТФ-азу актомиозина скелетных мышц, а в присутствии  $Ca^{++}$ , как и тропонин С мышц, активирует ее. Аминокислотный состав тропонина мозга идентичен таковому тропонина скелетных и сердечной мышц. В препарате нейростенина синаптосом обнаружены также Са-чувствительные белки, возможно, тропонин-тропомиозинового комплекса, которые отделяются от нейростенина в среде с низкой ионной силой, при этом активность Mg-АТФ-азы снижается. Последующее добавление этих белков восстанавливает чувствительность АТФ-азы нейростенина к ЭГТА (Mahendran et al., 1974).

Из мозгового слоя надпочечников также выделены актомиозин, сходный по свойствам с нейростенином (Trifaro, Ulpian, 1975), актин с отн. мол. м.  $45 \cdot 10^3$  (Phillips, Slater, 1975), тубулин из хромаффинных гранул (Redburn et al., 1972) и тропомиозинподобный белок с отн. мол. м.  $16 \cdot 10^3$  (Kuo, Coffee, 1976).

Где локализованы сократительные белки в нервных окончаниях? Ответ на этот важный вопрос поможет в какой-то степени выявить функцию этих белков в секреторном процессе. По данным Bergl и соавт. (1973), из СП мозга выделяется преимущественно стенин, а из синаптических мембран — нейрин, что доказывалось увеличением активности Mg-АТФ-азы при гибридизации с соответствующими белками мышц. При использовании электрофореза в полиакриламидном геле и наличии маркерных белков показано (Fine et al., 1975), что нейрин локализован преимущественно в цитозоле синаптосом и в синаптических мембранах; стенин — в СП и в меньшей степени в цитозоле и синаптических мембранах; тропомиозин — в синаптических мембранах и в меньшей степени в СП; тропонин — в

синаптических мембранах; белок с отн. мол. м.  $5 \cdot 10^4$  (возможно, филарин) — в СП. В микросомах мозга (Gurd et al., 1974) и в аксонах (Grefrugh, Reynolds, 1973) также выявляются белки, мигрирующие при электрофорезе подобно нейрину, тропониону и тубулину. Содержание нейрина во фракции синаптических мембран высокое и составляет 11% (Mahler et al., 1975).

### Ca-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ БЕЛКИ И МЕХАНИЗМ СЕКРЕЦИИ

К Ca-чувствительным белкам нервной ткани, в частности синаптических структур, относят тропонин- и тропомиозинподобные белки, нейроспецифический белок S-100 и белки-регуляторы фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов. Белок S-100 может секретироваться нервными окончаниями при возбуждении и встраиваться в пост-СМ (см. главы 4, 9). Секреция белка S-100, по-видимому, имеет характер экзоцитоза, поскольку этот белок обнаружен и в составе СП. Hyden (1974) предположил, что белок S-100 конкурирует с активными (филаментозными) нитями субсинаптической зоны пост-СМ за  $Ca^{++}$ , в этом случае происходит сорбция  $Ca^{++}$  белком S-100 с последующим расслаблением нитей, ослаблением «натяжения» между пре- и пост-СМ, вызывающим затруднение синаптической передачи. Наблюдается отрицательная регуляция секреции медиаторов. Возможно и другое объяснение функции белка S-100 в пост-СМ, точнее в синаптической щели. Белок S-100 может выполнять роль внеклеточного тропомиозина, «запускающего» процесс сокращения внесинаптических нитей и ускоренную доставку медиаторов к пост-СМ. В этом случае белок S-100 способен усиливать синаптическую передачу.

Каковы связывающие Ca зоны в синаптических структурах? «Горячие точки» связывания Ca в нервном окончании — это пре-СМ, цитозольные белки, мембраны СП (которые при контакте с пре-СМ могут образовывать комплекс актомиозина) и синаптические митохондрии; в постсинаптической структуре — это рецепторная зона пост-СМ и субсинаптическая сеть. Были сделаны попытки выявить эти зоны в синапсах электронно-микроскопическим методом. При фиксации нерва портняжной мышцы лягушки глутаральдегидом в присутствии 5—90 мМ  $CaCl_2$  на мембранах СП обнаружены участки связывания Ca (Politoff et al., 1974). Таким же методом выявлены плотные гранулы Ca (5—7 нм) на поверхности СП электрического органа ската (Boone et al., 1974) либо изолированных СП (Bohan et al., 1973). В седалищном нерве крыс оксалатным методом обнаружены связывающие Ca зоны на поверхности СП, между двумя наружными мембранами синаптических митохондрий и редко в примембранном слое аксональной мембраны. Микротрубочки и

нейрофиламенты не содержат Са. При увеличении частоты миниатюрных потенциалов концевой пластинки (препарат нервов — портняжная мышца лягушки) плотность зон Са не меняется в СП и увеличивается в области пост-СМ. Однако после локальной тепловой стимуляции, снижающей амплитуду миниатюрного потенциала, или после стимуляции электрическим током (10 Гц, 20—30 мин) СП теряют гранулы Са, но спустя 1—2 ч пребывания в покое в изотоническом растворе NaCl снова приобретают эти гранулы (Parras, Rose, 1976). Авторы сделали вывод, что связывающая Са зона мембран СП акцептирует Са<sup>++</sup>, которые входят в терминаль при деполяризации. Из аксоплазмы аксонов кальмара выделен кислый полипептид с отн. мол. м.  $14 \cdot 10^3$ , избирательно связывающий Са (Alemá et al., 1973).

При моделировании секреции эндогенного ацетилхолина изолированными СП мозга крыс обнаружено, что высвобождение этого медиатора происходит при инкубации СП с АТФ, Mg<sup>++</sup> и Са-чувствительным фактором, находящимся в составе цитозоля синапсом. Максимум секреции ацетилхолина наблюдается при содержании в среде 0,1 мМ Са<sup>++</sup>. По данным Nata и соавт. (1976), Са-чувствительный фактор является белком с низкой относительной молекулярной массой. По-видимому, в этих опытах отсутствует полная система сократительных белков, так как колхицин, винбластин, а также цАМФ и цГМФ не влияют на секрецию ацетилхолина. Известно, что цАМФ ускоряет высвобождение катехоламинов из хромаффинных гранул в присутствии АТФ и Mg<sup>++</sup> (Izumi, 1970). Ока и соавт. (1975) установили, что ускорение высвобождения катехоламинов достигается также добавлением в среду цитозоля секреторных клеток.

#### ГИПОТЕЗА О КОНТРАКТИЛЬНОЙ ПРИРОДЕ СЕКРЕЦИИ

Еще до обнаружения сократительных белков нервных окончаний мозга и железистых клеток высказывалось предположение о сократительном характере секреции медиаторов и гормонов (Р. Н. Глебов, 1970; Douglas, 1968; Rasmussen, 1970; Poisner, 1970).

Данная гипотеза была сформулирована после открытия системы сократительных белков в нервных окончаниях (Bergl et al., 1973). Можно предполагать универсальный механизм секреции медиаторов (и, по-видимому, гормонов из железистых клеток) при помощи белков сократительной системы СП, пре-СМ и цитозоля нервных окончаний (Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский, 1975, 1976). Цикл расслабление — сокращение комплекса актомиозина, регулируемый Са<sup>++</sup>, определяет секрецию передатчиков при смене состояния покой — возбуждение.

Медиаторы в покое находятся в СП в связанном виде, а сократительная система белков — в состоянии расслабления. При деполяризации пре-СМ пузырьки диффундируют за счет электростатических сил (внешние мембраны СП заряжены отрицательно) или за счет «скольжения» вдоль тубулярных или филаментозных нитей в примембранном слое пре-СМ, где они контактируют со специфическими комплементарными участками ми. может быть, между плотными выростами пре-СМ центральных синапсов, обращенных внутрь синаптоплазмы (см. главу 1). При контакте миозинподобный белок мембран СП связывается с актином пре-СМ и образуется комплекс актомиозиноподобного белка. Сокращение образовавшегося комплекса актомиозина инициируется  $Ca^{++}$ , которые накопились в синаптоплазме в результате деполяризации, и  $Ca$ -чувствительными белками (тропонин и тропомиозин) пре-СМ. В результате сокращения комплекса актомиозина медиаторы секретируют СП (высвобождаются) в участках контакта (в синаптопорах) и, минуя липидный (возможно, ганглиозидный) барьер, проникают в синаптическую щель и далее к рецепторам пост-СМ. Не исключена возможность изменения поверхностного натяжения пре-СМ в зоне контакта с мембраной СП вследствие образования комплекса актомиозина вплоть до создания «открытых пор» (синаптопор) в пре-СМ. Секреция медиаторов разными СП в предполагаемой схеме экзоцитоза может происходить параллельно, при этом каждым СП секретирется значительная доля запаса медиатора и его спутников. Число квантов медиатора при проведении нервного импульса в таком случае зависит от концентрации ионизированного  $Ca$  в синаптоплазме, количества контактирующих участков и уровня формирования синаптопор пре-СМ различных синапсов. По всей вероятности, происходящие при деполяризации структурные перестройки в аксональной мембране индуцируют соответствующие изменения в активной зоне пре-СМ, лабализуя актиновый компонент, который в покое может быть связан с гликолипидами. В результате «освобождения от липидной опеки» увеличивается доступность синаптопор для взаимодействия с СП. После прекращения возбуждения восстанавливается ионный градиент, при этом  $Ca^{++}$  выводится из терминалей при помощи  $Ca$ -насоса. Снижение концентрации  $Ca^{++}$  в терминалях, а также локальное увеличение содержания АТФ, способных вызывать диссоциацию нейростенина, приводят к расслаблению элементов сократительной системы. В этих условиях СП пополняют запасы медиаторов за счет их ресинтеза, обратного захвата из синаптической щели, т. е. СП могут многократно использоваться в синаптической передаче. По мнению Thoа и соавт. (1972), сократительные белки терминалей участвуют в секреции норадреналина на уровне мобилизации СП при помощи микротрубочек, обеспечивающих направленное смещение пузырьков к комплементарным

участкам пре-СМ, и на уровне непосредственного контакта СП с пре-СМ при помощи филаментов (или актина) в примембранном слое пре-СМ или в составе пре-СМ, обеспечивающих опорожнение содержимого СП в синаптическую щель. Фосфорилирование сократительных белков цАМФ-зависимой протениназой при деполяризации терминалей может быть регуляторным фактором сокращения (см. схему 4). Известно, что в культуре ткани сердечной мышцы крыс норадrenalин или дибутирил-цАМФ увеличивает активность АТФ-азы миозина;  $\beta$ -адреноликтик снимает эффект медиатора, но не цАМФ. Система цАМФ контролирует синтез миозина и предохраняет его от распада (Nagay et al., 1973).

Остановимся на фактах, подтверждающих рассмотренную гипотезу. В 1974 г. было показано (Puszkin, Kochwa, 1974), что взаимодействие изолированных СП мозга крыс с нейрином сопровождается, во-первых, увеличением активности Mg-АТФ-азы, что указывает на образование комплекса нейростенина; во-вторых,  $Ca^{++}$  увеличивают, а ЭГТА снимает этот эффект, что может указывать на присутствие в препарате нейрина связанных с ним тропонина — тропомиозина; в-третьих, при контакте происходит Ca-зависимое высвобождение в среду  $^{14}C$ -глутамата, предварительно аккумуляированного в СП. В нашей лаборатории этот опыт воспроизведен при изучении секреции эндогенного норадrenalина СП мозга крыс. Кроме того, образование актомиозинового комплекса регистрировали не только по АТФ-азной реакции, но и по реакции суперпреципитации (увеличение интенсивности светорассеяния при 520 нм при действии  $Mg^{++}$  и АТФ). Было также установлено, что цитохалазин В устраняет секрецию норадrenalина. Обнаружено (Г. Н. Крыжановский и др., 1974), что столбнячный токсин, нарушающий секрецию медиаторов, способен связываться с нейростенином мозга, угнетать Mg-АТФ-азу и реакцию суперпреципитации.

При исследовании свойств препаратов мембран хромаффинных гранул надпочечников выявили их селективное связывание с F-актином скелетных мышц, но не с миозином гладких мышц, что доказывалось биохимическими и электронно-микроскопическими методами (Buggidge, Phillips, 1975).

## МИТОТИЧЕСКИЕ ЯДЫ КАК БЛОКАТОРЫ СЕКРЕТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ

Важным доказательством участия сократительных структур микротрубочек и нейрофиламентов в секреторных процессах являются опыты по блокированию этих процессов *in vitro* митотическими ядами. Результаты первых опытов были опубликованы Spoor, Fergusson (1965). Колхицин при непрямой (трансинаптической) стимуляции портняжной мышцы лягушки угне-

тал синаптическую передачу, однако не оказывал влияния в случае прямой стимуляции френико-диафрагмального препарата мышцы. Было непонятно, почему в этих опытах эффект колхицина в первом случае снимался ингибиторами ацетилхолинэстеразы. Теоретически можно представить себе и постсинаптическое действие колхицина, нарушающего структуру субсинаптической сети пост-СМ. Впоследствии получены доказательства (Maeno, Edwards, 1969) того, что торможение синаптической передачи колхицином, а также винбластином и цитохалазином В (Katz, 1972) в нервно-мышечных препаратах связано с повреждением аппарата секреции в нервных окончаниях. Уменьшение квантового состава ВПСП связано не с истощением запаса медиаторов, а с нарушением механизма экзоцитоза. Колхицин при стимуляции электрическим током нерва, иннервирующего портняжную мышцу лягушки, обратимо снижал амплитуду и изменял квантовый состав постсинаптического потенциала, уменьшая вероятность освобождения каждого кванта, а также снижал частоту миниатюрного потенциала без изменения его амплитуды (Е. Е. Никольский и др., 1973). При избытке  $Ca^{++}$  (12,6 мМ) в инкубационной среде колхицин несколько слабее изменял амплитуду ВПСП. В опытах на блуждающем нерве кролика и на седалищном нерве крыс показано, что колхицин не вызывает изменений в проведении нервного импульса, т. е. может разобщить деполяризацию от секреции медиаторов (Albuquerque et al., 1972). При аппликации колхицина на участок седалищного нерва, расположенный вдали от нервных окончаний, установили, что на фоне сохранения механизма сопряжения деполяризации и секреции ацетилхолина постепенно развивается денервационный синдром, т. е. в этих условиях колхицин блокирует аксоток трофогенов, необходимых для нормальной иннервации.

Из опытов Albuquerque вовсе не следует, что выделение медиаторов и трофогенов из нервных окончаний имеет различные механизмы. Можно полагать, что в этих опытах наблюдается секреция ацетилхолина СП без высвобождения необходимых спутников секреции, поступление которых в терминали и последующая аккумуляция в пузырьках были заторможены вследствие угнетения аксотока.

По данным Hoffman и соавт. (1973), угнетение ВПСП в нервно-мышечных синапсах, вызванное колхицином, потенцируется избытком  $Mg^{++}$  в инкубационной среде. Цитохалазин В блокирует секрецию медиаторов при раздражении электрическим током культуры ткани цыпленка, состоящей из нервно-мышечных клеток (Rubin et al., 1976), а также вызванную секрецию ацетилхолина симпатическими ганглиями (Nakazato, Douglas, 1973).

В тканях сердца животных колхицин и цитохалазин В подавляют секрецию экзогенного  $^3H$ -норадреналина при калиевой



деполяризации и при действии тирамина или никотина (Rubin et al., 1976). Колхицин подавляет также вызванную секрецию эндогенного норадреналина в селезеночном нерве и семявыносящих протоках (Wooten et al., 1975). В последней работе получены убедительные доказательства, что колхицин, винбластин и цитохалазин В в одинаковой степени блокируют как вызванную секрецию норадреналина, так и секрецию дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, что указывает на специфическое повреждение механизма экзоцитоза. При калиевой деполяризации синапсом мозга крыс цитохалазин В подавляет секрецию меченых норадреналина и дофамина, но не влияет на вызванную секрецию меченых ГАМК и глутамата (Nicklas, Bergl, 1974). Аналогичные отрицательные результаты, получены при изучении действия колхицина и винбластина на высвобождение меченой ГАМК при калиевой деполяризации синапсом (Redburn, Cotman, 1974).

Митотические яды действуют на секрецию первыми окончаниями не только медиаторов (ацетилхолина и норадреналина), но и на секрецию гормонов различными железистыми клетками. Так, указанные выше митотические яды, особенно цитохалазин В, тормозят вызванную холиномиметиками секрецию липазы и химотрипсиногена из поджелудочной железы, секрецию инсулина из  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, гистамина из лаброцитов (тучные клетки), тироксина и других гормонов щитовидной железы, катехоламинов из мозгового слоя надпочечников.

## 9. Прямые и обратные транссинаптические связи

---

### РОЛЬ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ И ПРОСТАГЛАНДИНОВ В СИНАПТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Циклический аденозин-3',5'-монофосфат (цАМФ) был открыт Sutherland в 1957 г. (П. А. Кометиани, 1974; Bitensky, Gorman, 1973; Greengard, Kebabian, 1974). К системе циклических нуклеотидов относятся ферменты, участвующие в процессах синтеза и гидролиза цАМФ (или цГМФ) и протеинкиназа, чувствительная к циклическим нуклеотидам. Физиологическое действие системы цАМФ универсально и заключается (рис. 17) в том, что эффекторная клетка получает сигнал благодаря действию гормонов и медиаторов на специфические поверхностные рецепторы клеточных мембран. Это взаимодействие индуцирует синтез цАМФ («вторичных посредников») на внутренней стороне мембраны эффекторной клетки. цАМФ-зависимая протеинкиназа осуществляет конечное физиологическое действие. Таким образом, универсальность действия цАМФ, своеобразного внутриклеточного гормона-регулятора, заключается в том, что конечный физиологический ответ проявляется в различных клетках-мишенях однотипно, а именно за счет действия цАМФ-зависимых протеинкиназ. Один и тот же гормон или медиатор, действуя через посредство цАМФ, может вызвать в разных клет-

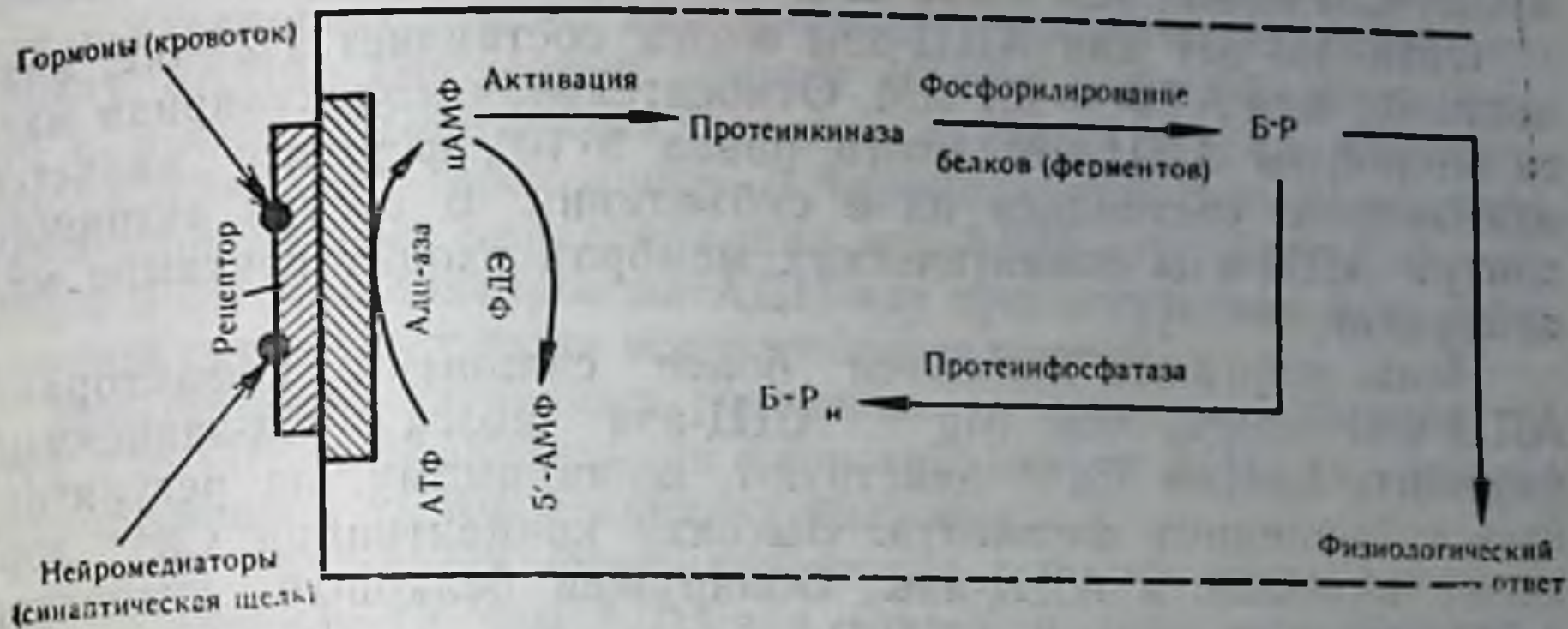
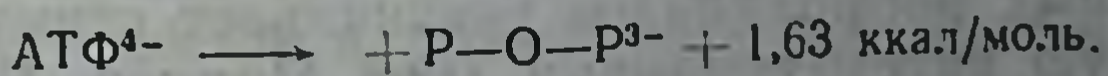
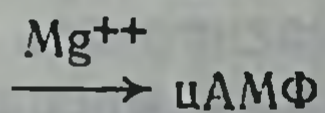


Рис. 17. Принцип действия циклических нуклеотидов.

Б — белок. Физиологический ответ: индукция синтеза ферментов, специфических белков, активация (или торможение) некоторых ферментов; регуляция сокращения — расслабления, проницаемости мембран, секреции гормонов и медиаторов.

ках-мишенях различное действие на обмен. Тип ответа генетически детерминирован функциональной особенностью эффекторной клетки. Разнообразие тканеспецифических эффектов цАМФ обусловлено природой и различием субстратов протеинкиназ в разных тканях и синапсах. Действие синаптических передатчиков (норадреналин, дофамин, серотонин, гистамин) на обмен постсинаптической клетки опосредовано через систему цАМФ. Синаптическое действие ацетилхолина опосредовано через систему цГМФ. Содержание цАМФ в тканях очень низкое ( $10^{-6}$ — $10^{-7}$ ), в клетке цАМФ значительно более лабилен, чем АТФ и 5'-АМФ. Для циклических нуклеотидов характерна очень высокая интенсивность обмена. Максимальное содержание цАМФ отмечается в гипофизе, зрительном бугре, мозжечке, в меньшей степени — в подбугорной области и наименьшее — в морском коньке, хвостатом ядре и продолговатом мозге. Распределение цАМФ не совпадает с распределением катехоламинов и серотонина.

**Аденилатциклаза (АДЦ-аза).** Этот фермент, открытый в 1962 г., участвует в синтезе цАМФ:



АДЦ-аза локализована на внутренней стороне клеточных мембран и частично в митохондриях и ядрах. Максимальная активность ее в тканях животных отмечается в мозге, особенно в сером веществе. В результате фракционирования нервной ткани установлено, что максимум активности АДЦ-азы наблюдается в синаптосомах и синаптических мембранах. По гистохи-

мическим данным (Weiss, Grayton, 1970) активность АДЦ-азы в пост-СМ выше, чем в пре-СМ.

Оптimum рН для АДЦ-азы мозга составляет 7,2—8,2; значение  $K_m$  для АТФ — 0,1 мМ. Относительная молекулярная масса молекулы АДЦ-азы мозга равна  $8 \cdot 10^5$ , фермент является олигомером, состоящим из 8 субъединиц. В состав активного центра АДЦ-азы синаптических мембран входит глутамин или аспарагин.

Ионы марганца являются более сильными кофакторами АДЦ-азы мозга, чем  $Mg^{++}$ . АДЦ-аза мозга — Са-зависимый фермент, причем  $Ca^{++}$  действуют, по-видимому, на регуляторную субъединицу фермента. Высокие концентрации  $Ca^{++}$  тормозят активность АДЦ-азы. Обнаружен белковый активатор АДЦ-азы (отн. мол. м.  $13 \cdot 10^2$ ).

Анионы фтора необратимо и аллостерически активируют АДЦ-азу млекопитающих, после чего стимуляции гормоном или медиатором ее не наблюдается. Предполагают, что АДЦ-аза существует в неактивной фосфорилированной форме. Дефосфорилирование может осуществляться  $F^-$  и стимулируемой гормоном фосфопротеид-фосфатазой. Когда концентрация цАМФ достигает критического уровня, он ингибирует собственный синтез, стимулируя киназу АДЦ-азы, которая фосфорилирует АДЦ-азу.

Особое внимание следует уделить фактам регуляции активности АДЦ-азы производными пурина. Известно, что низкие концентрации аденозина, АМФ и ГТФ активируют АДЦ-азу и их действие направлено на регуляторную субъединицу фермента. В связи с этим сторонники наличия пуринергических синапсов рассматривают регуляторную субъединицу фермента как рецептор пост-СМ для аденозина. Действие производных пурина, как правило, синергично действию гормонов на АДЦ-азу.

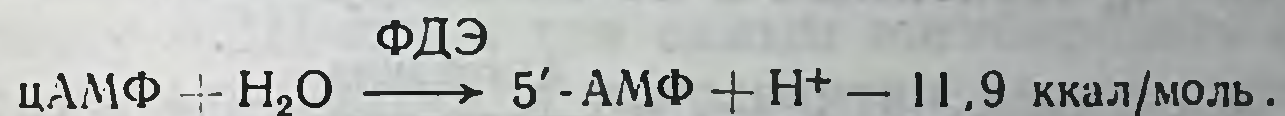
Известно, что АДЦ-аза сердца и мозга представляет собой липопротеид. Липидный компонент необходим для функционирования регуляторной субъединицы. Растворимая АДЦ-аза, полученная путем обработки мембран неионными детергентами, обладает ферментативной активностью, однако она не реагирует на действие гормонов. Если к растворимой АДЦ-азе добавить фосфолипиды (фосфатидилсерин и МФИ), то реконструированный фермент сердца способен реагировать с гормонами (Levey, 1971). Добавление к неочищенным препаратам синапсом указанных фосфолипидов увеличивает стимуляцию АДЦ-азы, вызванную катехоламинами (von Hungen, Roberts, 1974). АДЦ-аза является аллостерическим ферментом с выраженной асимметрией по отношению к наружной и внутренней сторонам мембраны. По мнению Robison и соавт. (1967),  $\beta$ -адренорецептор является либо регуляторной субъединицей АДЦ-азы, либо непосредственно индуцирует ее активность при действии катехоламинов. Стимуляция  $\beta$ -адренорецепторов многих тканей

приводит к активации АДЦ-азы и накоплению цАМФ, стимуляция  $\alpha$ -адренорецепторов, как правило, способствует снижению уровня цАМФ. Последний эффект может быть объяснен тем, что с  $\alpha$ -адренорецепторами нередко связано пресинаптическое возбуждение или торможение.  $\beta$ -Адренолитики снимают стимулирующий эффект норадреналина на АДЦ-азу. Эффекты гормонов и нейромедиаторов на АДЦ-азу при отсутствии в инкубационной среде  $\text{Ca}^{++}$  чаще всего не проявляются.

Большинство изученных гормонов и биогенных аминов *in vivo* и *in vitro* в значительной мере активирует АДЦ-азу, увеличивает уровень цАМФ в клетках-мишенях.

В ходе онтогенеза фосфодиэстераза раньше достигает максимума активности, чем АДЦ-аза. Оба фермента способны мигрировать в терминали с аксотоком (Gray et al., 1971).

**Фосфодиэстераза (ФДЭ).** ФДЭ циклических нуклеотидов, открытая в 1958 г., инактивирует свободный (не связанный с белком) цАМФ, разрушая его до 5'-АМФ и в редких случаях до 3'-АМФ:



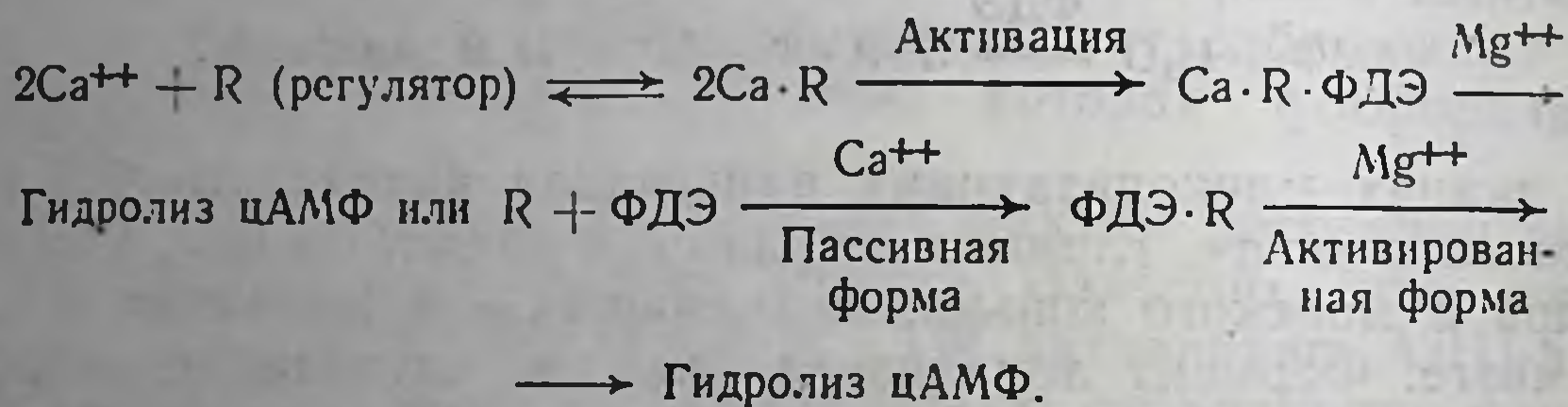
В тканях млекопитающих наивысшая активность ФДЭ обнаружена в мозге, главным образом в области коры, хвостатого ядра и морского конька, наименьшая — в мозжечке и спинном мозге. Фермент локализован как в цитоплазме нервных клеток, так и в различных мембранах; 60% активности ФДЭ связано с синаптическими мембранами и микросомами. По гистохимическим данным (Flogendo et al., 1971) в аксодендритических синапсах мозга ФДЭ в большей степени локализована в пост-СМ, чем в пре-СМ. В нервных окончаниях ФДЭ находится также в наружных мембранах СП (Johnson et al., 1973). Иногда, например в мышечной ткани, ФДЭ может быть локализована на поверхности клеточных мембран.

ФДЭ мозга термостабильна, имеет отн. мол. м.  $15 \cdot 10^4$ , оптимум рН 7,5—9,0, относительно высокую субстратную специфичность (цАМФ : цГМФ : цУМФ = 1 : 0,7 : 0,1). Значение  $K_m$  варьирует в диапазоне  $10^{-4}$ — $10^{-6}$  М в зависимости от объекта, изоформы и т. д. ФДЭ мозга имеет 2—4 изофермента, по крайней мере один из них отличается высокой отн. мол. массой, низким сродством к цАМФ и, возможно, существует в форме димера; другой имеет низкую отн. мол. массу (мономер), высокое сродство к низким концентрациям субстрата, однако с повышением концентрации субстрата сродство не увеличивается, а уменьшается (Thompson, Appleman, 1971). Низкомолекулярный изофермент является Mg, Ca-зависимым, а высокомолекулярная форма — только Mg-зависимой. Циклический ГМФ действует как конкурентный ингибитор гидролиза цАМФ в мозге,

и только в низких концентрациях он способен активировать гидролиз цАМФ.

Отрицательная кооперативность является проявлением тонкой естественной регуляции уровня циклических нуклеотидов, поскольку эта кинетическая буферная система позволяет удерживать достаточно высокий стационарный уровень цАМФ и защищать клетку от продолжительного действия высоких доз цАМФ путем гидролиза, протекающего с высокой скоростью в присутствии больших его концентраций. Считается, что таким свойством обладает в большей мере цитозольная ФДЭ, которая может активироваться при резкой стимуляции синтеза цАМФ.

Активность ФДЭ в мозге превышает активность АДЦ-азы в 100—400 раз (Weiss, Costa, 1968). К регуляторам ФДЭ относят эндогенные термостабильные белки-активаторы (отн. мол. м. 20—30·10<sup>3</sup>), не обладающие тканевой специфичностью, резко снижающие K<sub>м</sub> для цАМФ. Белок-регулятор активирует ФДЭ после комплексования с ферментом, причем этот процесс является Mg-зависимым и Ca-активируемым:



По-видимому, регулятор является тропонинподобным белком (Miki, Yoshida, 1972), так как в отсутствие белка-регулятора ЭГТА не влиял на активность ФДЭ мозга, а стимуляция Ca<sup>++</sup> была небольшой, в то же время без Ca<sup>++</sup> регулятор не активировал ФДЭ. По данным Wolff и соавт. (1974), белок-регулятор ФДЭ мозга свиньи представляет собой кислый фосфопротеид (отн. мол. м. 11,5—14·10<sup>3</sup>), в отношении 1 : 1 связывающий Ca<sup>++</sup>, причем обработка фосфатазой этого белка приводит к потере способности к связыванию Ca<sup>++</sup>. Этот белок не идентичен мышечному тропонину и белку S-100. По другим данным (Cheung et al., 1975), глобулярный белок-регулятор ФДЭ мозга имеет отн. мол. м. 15·10<sup>3</sup>, является кислым полипептидом, содержит 4 связывающих Ca участка и способен активировать в присутствии Ca<sup>++</sup> АДЦ-азу.

Накопление цАМФ после взаимодействия медиатора с рецептором пост-СМ вызывает изменение мембранной проницаемости (накопление свободных Ca<sup>++</sup> в клетке), вследствие чего цАМФ останавливает собственное физиологическое действие.

Имидазол, фенобарбитал, γ-оксимасляная кислота, аргинин, производные триазола и никотиновая кислота активируют ФДЭ. Ингибиторами ФДЭ мозга являются АТФ, пирофосфат, тиоло-

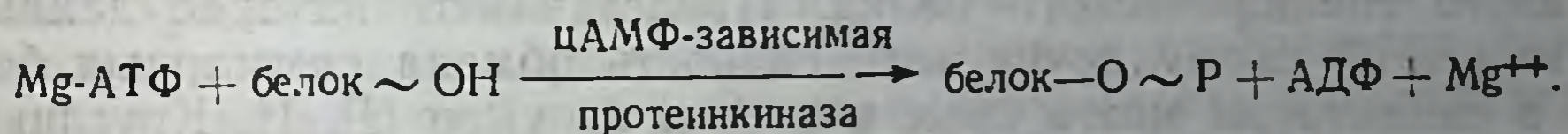
вые яды,  $\alpha$ -адренолитики, папаверин, трициклические антидепрессанты, этакриновая кислота, резерпин, ЛСД и индометацин. Как правило, гормоны, активирующие АДЦ-азу, не влияют на активность ФДЭ.

Аналоги цАМФ с замещением в 8-м (или в 6-м и 7-м) положении пуринового основания практически не гидролизуются ФДЭ, но более эффективно, чем цАМФ, активируют протеникиназу. Аналоги цАМФ с замещением в углеводном остатке гидролизуются ФДЭ, тормозят гидролиз цАМФ, но не действуют на протеникиназу. Введение дибутирильных радикалов в положение N-6 основания и в положение 2'-O углеводного остатка создает липофильный и малотоксичный аналог цАМФ, обладающий высокой степенью проницаемости, физиологической активностью цАМФ и устойчивостью к ФДЭ.

Классическими конкурентными ингибиторами ФДЭ мозга, которые способствуют накоплению цАМФ в тканях, являются производные метилксантина ( $10^{-3}$ — $10^{-4}$  М): теofilлин, кофеин, теобромин. Необходимо учитывать, что метилксантины способны также конкурировать с аденозином за регуляторную субъединицу АДЦ-азы и тем самым ингибировать фермент.

Фосфатидилинозитид и лизолецитин активируют ФДЭ мозга, выделенную из мембран (Wolff, Brastrom, 1976).

**цАМФ — кофактор протеникиназы.** Зависимая от цАМФ протеникиназа, не работающая в отсутствие цАМФ, фосфорилирует ОН-группу серина белков (ферментов)  $\gamma$ -концевым фосфатным остатком АТФ:



В скелетных мышцах и мозге обнаружены две протеникиназы, отличающиеся относительной молекулярной массой, оптимумом рН, чувствительностью к цАМФ и цГМФ и локализацией в клетках.

Протеникиназа состоит из двух субъединиц — каталитической и регуляторной; последняя ингибирует каталитическую субъединицу. Циклический АМФ связывает регуляторную субъединицу, активируя тем самым освобождающуюся каталитическую субъединицу. Оптимум рН термостабильного фермента составляет 7,0—9,0;  $K_m$  для цАМФ  $10^{-6}$ — $10^{-8}$  М (в зависимости от объекта), для АТФ  $10^{-5}$ — $10^{-6}$  М.  $\text{Mg}^{++}$  (2,5—10 мМ), а также  $\text{Mn}^{++}$  и  $\text{Co}^{++}$  активируют протеникиназу синаптических мембран, а  $\text{Ca}^{++}$  тормозят ее (Weller, Rodnight, 1974). Количество субъединиц в молекуле фермента варьирует в различных объектах. Относительная молекулярная масса каталитической субъединицы составляет 40—60· $10^3$ , а регуляторной субъединицы — 42—98· $10^3$ . Например, цАМФ-зависимая мембранная протеникиназа сердца крыс представляет собой олигомер  $\text{R}_4\text{K}_2$ ,

цАМФ-зависимая растворимая протеинкиназа мозжечка быка — олигомер  $R_2K$  с отн. мол. м.  $14 \cdot 10^4$  (Takai et al., 1975). Любые замещения атомов кислорода в 3',5'-циклофосфатном кольце приводят к полной потере активности фермента. В печени, мышцах и мозге катехоламины через систему цАМФ регулируют обмен гликогена, при этом цАМФ-зависимое фосфорилирование гликогенсинтетазы ведет к ее инактивации (т. е. когда начинается гликолиз, синтез гликогена выключается), а цАМФ-зависимое фосфорилирование киназы фосфорилазы «b» переводит фермент в активированное состояние, после чего в процессе фосфорилирования фосфорилаза «b» превращается в фосфорилазу «a», которая катализирует распад гликогена. В жировой ткани адреналин и АКТГ через систему цАМФ осуществляют фосфорилирование фосфолипаз, вследствие чего происходит липолиз. По-видимому, активация фосфолипаз происходит и в мозге при действии норадреналина и других медиаторов.

Протеинкиназа, зависимая от цАМФ, регулирует в тканях животных синтез РНК на уровне транскрипции (дерепрессия ДНК при фосфорилировании гистонов) и белка на уровне трансляции (фосфорилирование рибосомных белков). Эти данные позволили некоторым авторам связывать эффективность синаптической передачи при обучении с цАМФ-зависимым синтезом специфических белков (Siggins et al., 1969). М. Б. Штарк и соавт. (1974) высказали гипотезу, что определенный циклический нуклеотид в нейроне может индуцировать синтез только одного специфического белка. Представляют интерес данные, что цАМФ стимулирует интенсивность обмена суммарных белков синапсом мозга крыс в опытах *in vitro* (Р. И. Кругликов и др., 1975).

Протеинкиназа локализована как в цитозоле, так и в мембранах клеток. В синаптических мембранах мозга животных обнаружена высокая активность цАМФ-зависимой протеинкиназы (Johnson et al., 1972), фосфорилирующей эндогенные белки мембран. Эндогенное цАМФ-зависимое фосфорилирование белков мембран мозга крыс, которое протекает в присутствии  $^{32}P$ - $\gamma$ -АТФ и  $Mg^{++}$  очень быстро (в течение 5 с), характерно для двух типов белков: с отн. мол. м.  $86 \cdot 10^3$  (только для белков синаптических структур, но не для мембран печени, селезенки и почек) и  $48-49 \cdot 10^3$  (присутствуют и в мембранах других тканей). Второй белок легко солюбилизируется из синаптических мембран 0,25% раствором тритона X-100 и фосфорилируется цАМФ-зависимой растворимой и мембранно-связанной протеинкиназой. Интересно, что без  $Mg^{++}$  в инкубационной среде происходит частичное дефосфорилирование белка. Считается, что фосфопроteid-фосфатаза синаптических мембран является также цАМФ-зависимым ферментом (Maeno, Green-gard, 1972).



Регуляция строгой направленности каталитического действия протеникиназы осуществляется последовательно: на уровне связывания цАМФ регуляторной субъединицей; на уровне активации каталитической субъединицы (белки-модуляторы); на уровне белкового субстрата. Без такой регуляции фермент будет фосфорилировать все потенциальные субстраты.

**Синаптическая регуляция уровня цАМФ.** При стимуляции электрическим током срезов коры мозга морских свинок в ткани резко (до 10 раз) возрастает количество цАМФ (Kakiuchi et al., 1969; Pull, McIlwain, 1975). Биогенные амины и частично глутамат дают такой же эффект, который потенцируется адениловыми нуклеотидами и снимается тетродотоксином, высокими концентрациями  $Mg^{++}$  в среде (последние факторы приводят к снижению уровня секреции медиаторов) и ингибиторами ФДЭ. Различные способы деполяризации срезов коры мозга морских свинок (уабанин, KCl, вератрин, батрахотоксин или стимуляция электрическим током) вызывают Ca-зависимое накопление цАМФ и уменьшают содержание АТФ (Shimizu et al., 1970; Huang, Daly, 1974). Различные биогенные амины или аденозин оказывают почти такое же действие, как и деполяризующие факторы. Увеличение синтеза цАМФ в постсинаптических нейронах объясняется действием на регуляторные субъединицы АДЦ-азы, медиаторов и аденозина, секретлируемых нервными окончаниями, поскольку биогенные амины совместно с аденозином или амины совместно с деполяризующим воздействием синергично стимулировали накопление цАМФ в срезах ткани. Транссинаптически регулируемый уровень цАМФ в эффекторных клетках коры мозга в основном опосредован аденозином, так как введение в инкубационную среду аденозиндезаминазы снимает эффект при деполяризации нейронов.

Калиевая деполяризация препаратов диафрагмы крыс или пресинаптическая стимуляция электрическим током верхнего шейного ганглия кошек способствует накоплению цАМФ в тканях (McAfee et al., 1971); при этом прямая постсинаптическая стимуляция не приводит к увеличению интенсивности синтеза цАМФ. Действие на постганглионарные симпатические нейроны зависит от общего количества импульсов и их частоты (Chalzel et al., 1974).

При стимуляции электрическим током срезов мозга животных в присутствии меченого ортофосфата отмечено быстрое увеличение интенсивности обмена фосфопротенидов, характерное для нейронов, но не нейроглии (Williams et al., 1974). Тетродотоксин тормозит увеличение скорости фосфорилирования (вероятно, из АТФ) белков в срезах мозга при стимуляции электрическим током (Reddington et al., 1973).

При денервации норадреналинергических структур мозга чувствительность АДЦ-азы к норадреналину значительно увеличивается (Weiss, Grayton, 1970). Возможно, что симпатиче-

ская иннервация в условиях длительного возбуждения оказывает тормозящее действие на АДЦ-азу пост-СМ.

**Функция цГМФ.** Этот циклический нуклеотид открыт в 1963 г. Концентрация цГМФ в тканях в 10—15 раз меньше, чем цАМФ. Наиболее высок уровень цГМФ в легких и тканях мозга. Действие ацетилхолина на М-холинорецепторы гладких мышц кишечника, сердца, щитовидной железы, лимфоцитов, а также мозжечка связано с увеличением содержания в тканях цГМФ (Fergendelli et al., 1974). Обработка ткани сердца изопроterenолом снижает уровень цГМФ и увеличивает содержание цАМФ (Goldberg, 1970). Уровень цГМФ повышается при действии секретина и инсулина в печени и жировой ткани, брадикинина в легких, гистамина в эпителиальных клетках, а также окситоцина и серотонина в некоторых тканях. Во многих отношениях цГМФ является антагонистом цАМФ. Так, цГМФ стимулирует пролиферацию, но тормозит дифференцировку клеток, в то время как цАМФ стимулирует дифференцировку. Существуют еще не совсем ясные взаимоотношения между циклическими нуклеотидами. Например, ацетилхолин, действуя на М-холинорецепторы матки крыс, вызывает в присутствии адреналина снижение уровня цАМФ. В отсутствие адреналина эффект не проявляется. В сердечной мышце ацетилхолин угнетает АДЦ-азу.

Гуанилатциклаза в отличие от АДЦ-азы не тормозится F-, локализована не только в клеточных мембранах, но и в цитозоле клеток, например в цитозоле синапсом (Gogidis, Morgan, 1973). Мембранно-связанная гуанилатциклаза мозга в отличие от растворимой активируется азидом Na, гидроксиламином и фенилгидразином (Kimura et al., 1975). Азид Na и F- аддитивно стимулируют АДЦ-азу;  $Mn^{++}$  в большей степени стимулируют гидролиз цАМФ, а  $Mg^{++}$  — гидролиз цГМФ. Тщательный кинетический анализ указывает на то, что оба циклических нуклеотида подвергаются гидролизу одним ферментом (Brostrom, Wolff, 1976).

**Пресинаптические эффекты цАМФ.** Циклические нуклеотиды проявляют биологическую активность внутри клеток, цАМФ не проникает через клеточную мембрану, но может выходить из клеток во внеклеточную среду. Эффекты внеклеточного цАМФ связаны с изменениями в распределении внутриклеточного Ca. Биологические эффекты цАМФ связаны с мобилизацией и иммобилизацией Ca. По мнению Bressenbridge и Gray (1970), иммобилизация Ca происходит в результате образования комплекса с АТФ в цитозоле (или в мембранах). Аденилатциклаза, разрушая АТФ, переводит Ca в ионную форму, что облегчает связывание  $Ca^{++}$  с фосфолипидами или фосфопротеидами. В аксональных мембранах проведение импульса (см. схему 4) может индуцировать конформационные перестройки, приводящие к активации АДЦ-азы. На основе анализа многочисленных

фактов Rasmussen (1970) высказано предположение о том, что Ca-зависимая секреция гормонов железистыми клетками и нейромедиаторов нервными окончаниями модулируется цАМФ (табл. 11). Система цАМФ в нервных окончаниях является вероятным сопрягающим фактором между деполяризацией и секрецией. Внутриклеточный цАМФ усиливает пассивный транспорт и мобилизует Ca. Кроме того, модулирующая роль цАМФ в нервных окончаниях (чаще всего в тех, которые содержат в мембранах рецепторы для медиаторов) заключается в стиму-

Таблица 11

Циклический АМФ как модулятор Ca-зависимой секреции веществ  
(по Rasmussen, 1970, с изменениями)

Клетка	Раздражитель	Ответная реакция (секреция)	Зависимость от Ca <sup>++</sup>	Синтез цАМФ в клетке
Синапс	Стимуляция электрическим током, KCl	Медиатор	+	+
Передний отдел гипофиза	Релизинг-фактор гормона роста	Гормон роста	+	+
То же	Релизинг-фактор лютеинизирующего гормона	Лютеинизирующий гормон	+	+
» »	Релизинг-фактор тиреотропин	Тиреотропный гормон	+	+
Задний отдел гипофиза	Стимуляция электрическим током	Вазопрессин	+	?
Слюнная железа	Адреналин	Амилаза	+	+
β-Клетки поджелудочной железы	Глюкоза	Инсулин	+	+
Корковый слой надпочечников	АКТГ	Стероидные гормоны	+	+
Щитовидная железа	Норадреналин	Ацетилхолин, мелатонин	+(?)	+
Мозговой слой надпочечников	Стимуляция электрическим током	Адреналин	+	+
Щитовидная железа	Тиреотропный гормон	Тироксин	+	+
Желтое тело	Релизинг-фактор лютеинизирующего гормона	Прогестерон	+	+
Желудок	Гистамин	Хлористоводородная кислота	+	+
Нервно-мышечный синапс (скелетные мышцы)	Адреналин	Ацетилхолин	+	+

ляции сократительных процессов (см. главу 8). Дополнительным фактором иммобилизации Са внутри терминалей, как и в эффекторной клетке, может быть торможение Са-насоса. По нашим данным (Р. Н. Глебов и др., 1976), стимуляция электрическим током синаптических мембран инактивирует транспортную Са-АТФ-азу.

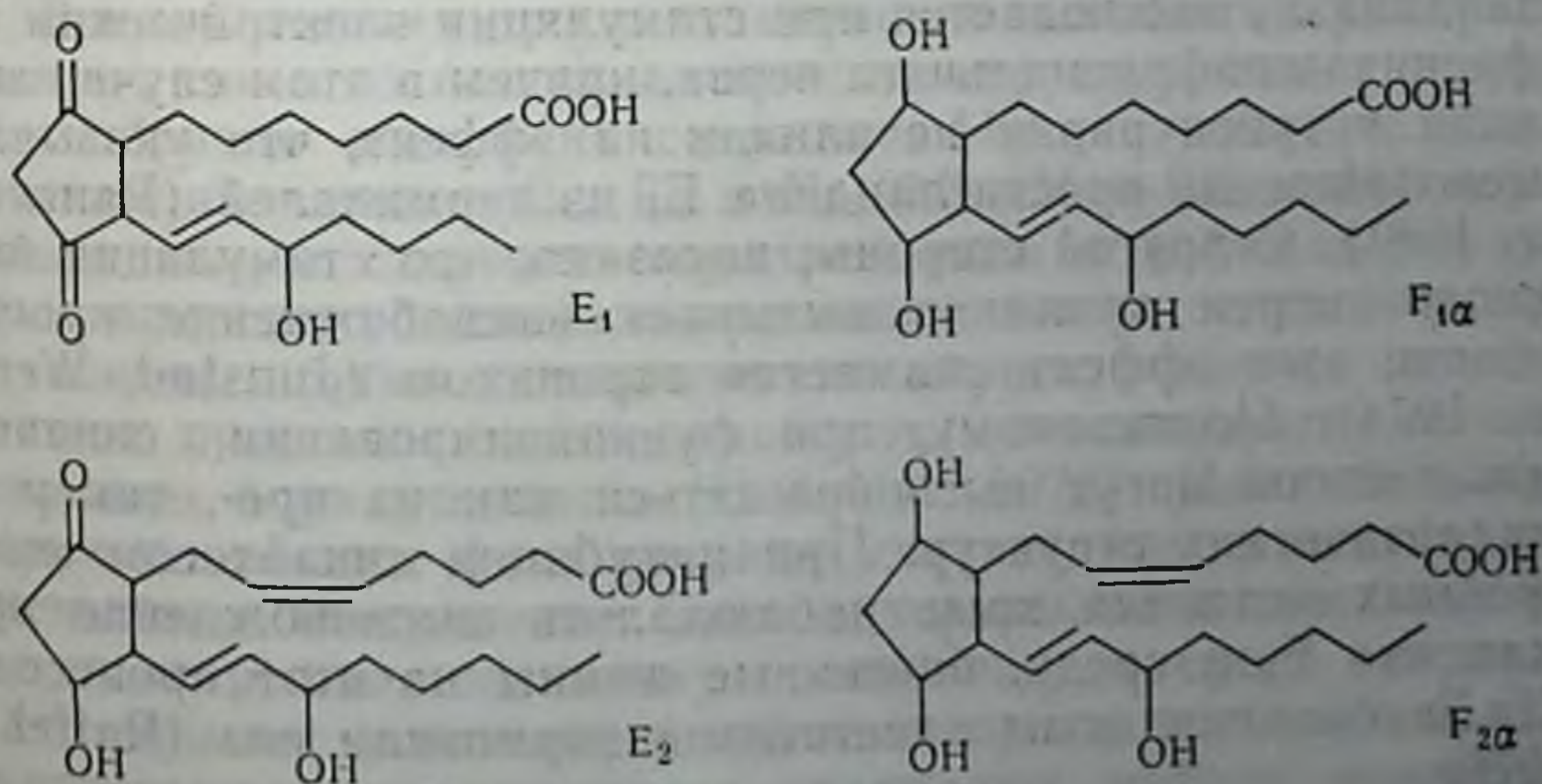
Дибутирил-цАМФ увеличивает Са-зависимую секрецию норадреналина и дофамин- $\beta$ -гидроксилазы при стимуляции электрическим током в семявыносящих протоках морской свинки (Wooten et al., 1973). В безкальциевой среде дибутирил-цАМФ также способен усиливать процесс спонтанной и вызванной секреции. Предполагают, что цАМФ является модулятором секреции, увеличивая пассивный транспорт Са<sup>++</sup> через пре-СМ либо способствуя высвобождению мембранно-связанного Са (например, в безкальциевой среде). Аналогичные эффекты цАМФ описаны при стимуляции электрическим током селезеночного нерва кошек. Введение цАМФ в подглоточные ганглии виноградной улитки вызывает деполяризацию и увеличение частоты спонтанной активности, введение цГМФ — наоборот, гиперполяризацию (Е. А. Либерман и др., 1975). Теофиллин и дибутирил-цАМФ увеличивают квантовую секрецию ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах, аналогичное действие на выброс ацетилхолина оказывало деполяризующее действие адреналина, который вызывает накопление цАМФ в терминалях (Goldberg, Singer, 1969). Rasmussen (1970) удалось показать, что в условиях, когда секреция медиаторов затруднена (отсутствие Са<sup>++</sup> или высокая концентрация Mg<sup>++</sup> в среде), адреналин не деполяризует клетки срезов околоушной железы морской свинки, но стимулирует образование цАМФ. В нормальных условиях (раствор Кребса — Рингера) воздействие адреналина или калиевой деполяризации приводит к усилению образования цАМФ и секреции ацетилхолина. При перфузии в бескальциевой среде надпочечники не секретируют катехоламинов в ответ на действие КСI или никотина, но секреция инициируется в присутствии цАМФ (Peach, 1972).

**Состояние проницаемости синаптических мембран и цАМФ.** Показано, что в тканях сердца деполяризация мембран связана с активацией  $\beta$ -адренорецепторов и системы цАМФ (Sugawicz, 1974); в постганглионарных нейронах верхнего шейного ганглия гиперполяризация связана с дофаминергической передачей, имитируется цАМФ и усиливается теофиллином, в то время как активация М-холинорецепторов постганглионарных нейронов приводит к образованию медленного ВПСП, причем последний эффект имитирует цГМФ (Greengard, Keibarian, 1974). Гиперполяризация грушевидных невроцитов мозжечка крыс связана с адренорецепторами и системой цАМФ (Siggins et al., 1973). Ионофоретическое введение дибутирил-цАМФ в грушевидные невроциты воспроизводит гиперполяризующее

действие норадреналина. То же показано в отношении гладких мышц и слизистой оболочки кишечника.

**Циклический цАМФ как регулятор сокращений — расслабления в мышцах.** Сокращение мышц имеет довольно сложную природу: гормональная или медиаторная деполяризация мышц → накопление внутриклеточного  $\text{Ca}^{++}$  из саркоплазматической сети (при участии системы цАМФ) → связывание кальция  $\text{Ca}^{++}$  чувствительными белками (тропонин и тропомиозин) → активация актина → реакция актина с миозином → образование комплекса актомиозина, гидролиз АТФ и сокращение нитей миофибрилл. Без  $\text{Ca}^{++}$  тропонин инактивирует актиновые филаменты. Накопление АТФ в клетках приводит к диссоциации актомиозина и активации фактора релаксации и активного транспорта  $\text{Ca}^{++}$  внутрь саркоплазматической сети, при этом происходит расслабление сократительных элементов. Накопление цАМФ в клетках вызывает снижение активности  $\text{Ca}$ -насоса с последующим накоплением  $\text{Ca}^{++}$  в цитозоле. В гладких мышцах цАМФ регулирует релаксацию, расслабление, а в скелетных мышцах — усиливает сокращение (Rasmussen, 1970). Позднее было выяснено, что со стимуляцией  $\alpha$ -адренорецепторов в гладких мышцах связана релаксация (через накопление цАМФ), а со стимуляцией  $\beta$ -адренорецепторов — сокращение (через снижение уровня цАМФ).

**Простагландины.** Этот класс ненасыщенных оксикарбоновых жирных кислот, производных простаноевой кислоты, обладающих высокой биологической активностью, был открыт в 1937 г., но детальное изучение началось в 1962 г. (Х. М. Марков, 1970). Из известных 14 типов простагландинов в головном и спинном мозге обнаружены четыре:  $\text{E}_1$ ,  $\text{E}_2$ ,  $\text{F}_{1\alpha}$  и  $\text{F}_{2\alpha}$ , предшественниками синтеза которых являются незаменимые жирные кислоты — дигомо- $\gamma$ -линолевая и арахидоновая:



Синтез простагландинов активируется глутатионом, морфином,  $\text{Cu}^{++}$  и тормозится некоторыми жирными кислотами, салицилатами (аспирин), индометацином (структурный аналог се-

ротонина и мелатонина) и хлорпромазином. В мозге собак простагландины распределены более или менее равномерно во всех отделах (1—3 мкг на 1 мг ткани), за исключением продолговатого мозга, где их несколько меньше. Синтез простагландинов осуществляется непосредственно в мозге.

В коре мозга крыс простагландины типа Е локализованы в синапсосомах, в том числе и в СП; тип F распределен в нервных клетках диффузно (Whittaker, 1968). Синтез простагландинов происходит в микросомах, т. е. в теле нейрона, далее жирные кислоты с аксотоком поступают в нервные окончания. Синтез простагландинов в синапсосомах незначителен (Raffel et al., 1976).

Простагландины находятся в клетках в неактивном состоянии (в виде эфиров), освобождение их из мембранно-связанного состояния приводит к их активации. Существует обширная литература по спонтанной и вызванной секреции простагландинов тканями мозга при раздражении головного и спинного мозга *in vivo*, при введении стимуляторов нервной системы (стрихнин, пикротоксин), серотонина и ДОФА (Ramwell, Shaw, 1966).

Учитывая, что блокада  $\alpha$ -адренорецепторов подавляет секрецию простагландина типа Е<sub>2</sub> в кровоток в ответ на стимуляцию селезеночных нервов собаки или введение норадреналина (Gilmore et al., 1968), можно полагать, что речь идет не о секреции простагландинов нервными окончаниями, т. е. не об их медиаторной природе, а о специфическом высвобождении простагландина Е<sub>2</sub> из эффекторной клетки в среду.

Выделение простагландина Е<sub>1</sub> надпочечниками вызывается ацетилхолином и АКТГ, однако никотин стимулирует секрецию только катехоламинов, но не простагландина Е<sub>1</sub> (Ramwell et al., 1966). Эти факты указывают на то, что высвобождение простагландинов не является экзоцитозом. Высвобождение простагландина Е<sub>1</sub> наблюдается при стимуляции электрическим током френико-диафрагмального нерва, причем в этом случае ацетилхолин и тубокурарин не влияли на эффект, что указывает на высвобождение простагландина Е<sub>1</sub> из терминалей (Ramwell, Shaw, 1967). С другой стороны, показано, что стимуляция блуждающего нерва кроликов вызывает высвобождение простагландинов, этот эффект снимается атропином (Junstad, Wennmalm, 1974). По-видимому, при функционировании синапсов простагландины могут высвобождаться как из пре-, так и из постсинаптических структур. При инкубации синапсом мозга в аэробных условиях крыс наблюдалось высвобождение простагландина Е<sub>2</sub> в среду, биогенные амины на этот процесс не влияли, а большие дозы анестетиков тормозили его (Raffel et al., 1976).

Действие экзогенных простагландинов на различные физиологические и биохимические процессы в эффекторных клетках (в том числе в постсинаптических структурах), как правило, не

связано с их прямым влиянием на рецепторы для медиаторов и гормонов, однако действие эндогенных простагландинов может быть опосредовано через эти рецепторы. Анализ многих работ показал (Bitensky, Gorman, 1973), что введение простагландинов E вызывает во многих тканях, в том числе и в мозге, увеличение содержания цАМФ, однако в некоторых тканях (жировая ткань, грушевидные невроциты мозжечка, матка) простагландины типа E устраняют увеличение содержания цАМФ, вызываемое действием норадреналина и других гормонов. Простагландин E<sub>1</sub> тормозит накопление цАМФ в постганглионарном нейроне верхнего шейного ганглия, вызванное дофамином. Простагландин F<sub>2α</sub> в отличие от типа E может обуславливать накопление цАМФ в некоторых эффекторных клетках. По мнению Smythies (1972), функционирование β-адренорецепторов связано с участием простагландинов, а функционирование α-адренорецепторов не требует его. Конечный биохимический эффект простагландинов определяется типом рецепторов для медиаторов и гормонов на мембране эффекторных клеток (рис. 18). Точкой приложения действия наиболее широко изученных простагландинов E является АДЦ-аза. Предполагают, что простагландин E<sub>1</sub> способствует дефосфорилированию АДЦ-азы, а мембранная или цитозольная протеинкиназа в присутствии цАМФ фосфорилирует ее, уменьшая активность. Примером синергизма действия простагландинов E и катехоламинов является Na,K-АТФ-аза. Как адреналин, так и простагландины E тормозят активность Na,K-АТФ-азы слизистой оболочки желудка человека, в то время как ацетилхолин ингибирует транспортную АТФ-азу (Mózsik et al., 1974). На синапсах коры мозга крыс показано, что как простагландины E, так и норадреналин стимулируют Na,K-АТФ-азу, причем эффект опосредован через α-адренорецептор (Gilbert et al., 1975).

Высвобождение простагландинов в межклеточную среду как из пре-, так и из постсинаптических структур может определенным образом влиять на секрецию. Низкие концентрации простагландинов типов E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> и F<sub>2α</sub> (3,0 нМ — 0,3 мкМ) тормозят Ca-зависимую секрецию норадреналина и дофамин-β-гидроксилазы при стимуляции электрическим током селезеночного нерва кошки, других симпатических нервов, причем ингибиторы синтеза простагландинов, наоборот, потенцируют вызванную секрецию норадреналина (Hedqvist, 1974). Данный автор, обнаруживший этот факт впервые, считает, что простагландины E уменьшают поступление Ca<sup>++</sup> в терминали и тем самым тормозят секрецию, поскольку повышение в среде содержания Ca<sup>++</sup> снимает угнетающее действие простагландинов E. Пресинаптические α-адренолитики усиливают эффект простагландинов E, которые блокируют Ca-зависимую секрецию норадреналина при стимуляции электрическим током адренергических нервных окончаний радужной оболочки кролика и не влияют



Рис. 18. Синаптическое действие простагландинов.

на обратный захват медиатора терминалями. Результаты указывают на регуляцию секреции норадреналина простагландинами по типу отрицательной обратной связи (см. рис. 18). Пока не ясно, как быстро инактивируются простагландины в синаптической щели, но предполагается наличие нейронов с высокой активностью простагландин-дегидрогеназы. Простагландины типа F в отличие от простагландинов E усиливают эффекты синаптической стимуляции и в ряде случаев увеличивают реакцию рецепторов на норадреналин. Облегчение адренергической передачи, вызываемое простагландинами F, обнаружено главным образом в гладкомышечных элементах сосудистой стенки. Простагландин F<sub>2</sub> в способен усиливать секрецию катехоламинов мозговым слоем надпочечников. Предполагается, что простагландины F и E являются конкурентными модуляторами секреции норадреналина (Brody, Kadowitz, 1974).

Таким образом, данные литературы указывают на гормональную, а не на медиаторную функцию простагландинов в синаптических структурах. Действие этих биологически активных веществ тесно связано с системой циклических нуклеотидов. Первичным эффекторным звеном для простагландинов является модуляция активности мембранных ферментов, опосредованная (или сопряженная) изменениями фазового состояния липидного слоя мембран. Такая модуляция может осуществляться на уровне не каталитических центров, а рецепторов и регуляторных центров. Рецепция простагландинов в мембранах связана с фосфолипидами и SH-группами белков.



## ТРОФИЧЕСКОЕ ВЛИЯНИЕ ЧЕРЕЗ СИНАПС И ОБРАТНЫЕ СИНАПТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ

Трофическое влияние через синапс заключается в том, что исполнительный нейрон не только обеспечивает транссинаптическую передачу нервного импульса, но регулирует обмен и функцию эффекторной клетки. Следует различать прямые и обратные трофические влияния: эффекторная клетка при образовании функционального синаптического контакта регулирует метаболизм и функцию исполнительной клетки, рост и развитие терминалей. Атрофия нервов при неадекватной иннервации (перезка сухожилий, бездействие и т. д.) обусловлена недостаточностью трофических влияний со стороны мышц. Об этом же свидетельствуют факты, что регенерирующие нервные окончания скорее иннервируют прежние концевые пластинки, чем образуют новые участки иннервации. Постганглионарная аксотомия вызывает изменения (хроматолиз) в преганглионарном нейроне верхнего шейного ганглия крыс (Matthews, Nelson, 1975).

После открытия функции системы циклических нуклеотидов принцип универсальной регуляции обмена веществ может относиться и к нервной трофике. Для изучения трофики важны опыты по денервации мышц, в которых постденервационные изменения являются следствием утраты X-трофического вещества (трофоген) или группы X-трофогенов, переходящих при иннервации в постсинаптические структуры (Г. Н. Крыжановский и др., 1974; Guth, 1969). Основными методами исследования нервнотрофической регуляции мышц животных являются: денервация мышц, действие *in vitro* агентов, блокирующих секрецию медиаторов (например, столбнячный и ботулинический токсины), при условии сохранности синаптического контакта; действие митотических ядов (колхицин и др.), блокирующих аксотоков веществ, в том числе и трофогенов (Albuquerque et al., 1972).

**Трофогены.** Ясно, что трофогенами могут быть вещества, секретлируемые нервными окончаниями в синаптическую щель, которые либо связываются с рецепторами на пост-СМ (здесь и далее чаще всего имеется в виду мышечная мембрана), запускающие новую генетическую программу обмена веществ внутри клетки, в том числе и на клеточной оболочке; либо встраиваются в состав пост-СМ как пластический материал; либо проникают внутрь клетки, где и регулируют обмен. Трофогены могут поступать в нервные окончания с аксотоком. Феномен Гинецинского проявляется тем раньше, чем ближе к концевым пластинкам перерезают моторный нерв. Трофогены мигрируют в этих опытах с медленным аксотоком. После перерезки нерва за небольшой срок до уоллеровской дегенерации стимулируется обмен гликогена в мышцах в месте иннервации, замедляется со-

кратительный процесс. Эти эффекты не наблюдаются при простом бездействии мышцы (Экклс, 1966).

Перечислим основные вещества, способные поступать из нервного окончания в синаптическую щель или обнаруживающиеся в синаптической щели: медиаторы; кислые белки типа везикулина и хромогранинов, а также дофамин- $\beta$ -гидроксилаза; адениловые нуклеотиды и, возможно, РНК; ферменты (например, ацетилхолинэстераза, выявляемая в синаптической щели и встраиваемая при развитии синапсов в пост-СМ); простагландины; глюкоза, аминокислоты и т. д.; нейроспецифические белки (например, белок S-100). С нашей точки зрения, в роли трофогенов выступают белки СП, секретлируемые вместе с медиаторами.

Радиоавтографическим методом выявлен аксональный транссинаптический перенос меченых аминокислот (в составе белков) в системе подъязычный нерв — мышца кролика, в зрительном тракте мозга золотой рыбки, мотонейронах спинного мозга животных, в системе зрительные пути — полосатое тело мозга мышей. По данным Dgoz и соавт. (1973), в ресничном ганглии цыплят доля переносимых транссинаптически белков составляет 10%. В этих опытах авторы не получили доказательств транссинаптического переноса гликопротеидов.

Синаптический контроль синтеза холинорецепторов мышц. В 1942 г. А. Г. Гинецинский и Н. М. Шамарина (А. Г. Гинецинский, 1961; Н. М. Шамарина, 1971) открыли интересный феномен: скелетные мышцы животных на всем своем протяжении обладают к моменту рождения чувствительностью к ацетилхолину, а в ходе постнатального онтогенеза зона холинорецепторов быстро суживается, располагаясь исключительно в области иннервации. После денервации происходит обратный процесс: зона холинорецептора расширяется и постепенно охватывает всю поверхность мышечного волокна.

Данный феномен взаимопревращений синаптических и несинаптических холинорецепторов в дальнейшем был воспроизведен при различных условиях выключения трофических влияний многими исследователями (Thesleff, 1974). После денервации внесинаптические холинорецепторы появляются там, где их раньше не обнаруживали. Постепенное расширение от центра (синапса) вдоль волокна указывает на то, что конечный эффект инициируется именно областью реиннервации, а не просто прекращением функции мышцы (плотность холинорецепторов в денервированных мышцах составляет  $1 \cdot 10^3$  молекул на  $1 \text{ мкм}^2$ , в то время как в иннервированном волокне плотность синаптических холинорецепторов  $1,3 \cdot 10^4$ , а несинаптических — менее 5 на  $1 \text{ мкм}^2$ ). Чувствительность синаптических холинорецепторов после денервации не изменяется, а активность ацетилхолинэстеразы обнаруживается в области иннервации. Даже слабая степень деполяризации в области каждого холино-

рецептора денервированных мышц оказывается достаточной, чтобы вызвать пороговую деполяризацию всего волокна. Иннервация подавляет синтез новых несинаптических холинорецепторов благодаря репрессии синтеза при помощи неизвестного трофогена нервных окончаний. После денервации (т. е. отсутствие трофогена) происходит дерепрессия синтеза холинорецепторов на уровне транскрипции. В этих условиях синтез новых несинаптических холинорецепторов блокируется актиномицином D и пурамицином. Новые холинорецепторы в основном идентичны по свойствам синаптическим, хотя имеются некоторые структурные различия.

Таким образом, при образовании синапсов в скелетных мышцах осуществляется трофический контроль синтеза молекул M-холинорецепторов в цитоплазме и их последующее встраивание в мембраны. По-видимому, идея о предсуществовании в мышцах пассивных холинорецепторов, которые инактивированы в норме трофогенами, неверна. Однако в ганглионарных клетках, помимо синаптических H-холинорецепторов имеются и несинаптические M-холинорецепторы, причем неактивное состояние последних в норме зависит от деятельности синаптических рецепторов. При денервации нейронов вегетативных ганглиев чувствительность H-холинорецепторов не меняется, а M-холинорецепторов резко возрастает. Возникновение синапсов может приводить к изменениям в постсинаптических структурах, которые развиваются по типу иммунного ответа (Г. Н. Крыжановский и др., 1974). Такой подход к оценке трофических влияний «наведения» пресинаптическими структурами перестроек в пост-СМ позволяет понять формирование быстрых и медленных синапсов, возникновение холинорецепции в гладких адренореактивных мышцах и, наоборот, возникновение адренорецепции в скелетных холинореактивных мышцах, образование несинаптических холинорецепторов в вегетативных ганглиях, образование синапсов-химер и т. д.

Изучение нервной трофики привело к выводу о том, что синаптическая активность регулирует процесс транскрипции в мышцах (В. С. Ильин и др., 1972). Денервация вызывает обратимые изменения синтеза белка и РНК в мышцах и изменениях спектра изоферментов гликолиза и цикла Кребса. Эти изменения ликвидируются при реиннервации и снимаются ингибиторами синтеза белка и РНК, не возникают в атрофирующейся от бездействия мышце с сохранной иннервацией.

**Нервная трофика и проницаемость мембран.** В медленных тонических мышцах лягушки, обычно не возбудимых электрическим током, после денервации появляются потенциалы действия, а в мышцах млекопитающих электровозбудимые Na-каналы модифицируются и не блокируются тетродотоксином. Актиномицин D снимает эти изменения возбудимых мембран, вызванные денервацией мышц (Miledi et al., 1971). Интересной

особенностью денервации является повышенная чувствительность денервированных мышц к адреналину (А. Д. Адо и др., 1946). При денервации диафрагмы крыс недавно было показано снижение ТМП покоя (Gray et al., 1976). Этот эффект снимается адреналином и дибутирил-цАМФ (в присутствии теофиллина), но не изменяется при аппликации пурамицина и актиномицина D. Убаин, как и следовало ожидать, в норме снижает ТМП, но не изменяет его при денервации. В последнем случае удалось добиться снижения ТМП только в присутствии дибутирил-цАМФ. На основании этого сделан вывод, что при денервации блокируется Na,K-насос, однако катехоламины и цАМФ способны стимулировать его. Снижение активности Na,K-АТФ-азы в денервированных мышцах объясняет уменьшение порога возбуждения и усиление пассивного транспорта  $Na^+$  и  $K^+$  (Jenkinson, Nicholls, 1961).

### ТРОФИКА НЕЙРОНОВ И МЕХАНИЗМЫ ПАМЯТИ

Группа нейронов в ЦНС может быть временно или постоянно интегрирована в систему активно функционирующих нейронов. Такое интегрирование индуцирует новые свойства в активных нейронах путем трофического влияния через синапс. Таким образом, трофика нейронов в ЦНС может включать и такое сложное явление, как память (И. П. Ашмарин, 1975). Механизмы формирования долговременной памяти могут быть связаны с рядом специфических структур мозга (морской конек, черная субстанция, хвостатое ядро, миндалевидное тело), в то время как хранение памяти является функцией большей части мозга, главным образом коры больших полушарий. Кратковременная память — процесс запоминания и фиксации определенных путей, переключений в синаптической сети, который длится от момента воздействия до 2—500 мс. Механизм кратковременной памяти основан на реверберации импульсов и образовании лабильных соединений в синапсах. Этот процесс подавляется электрошоком, блокаторами проведения в синапсах, холинолитическими средствами, снижением температуры и не блокируется ингибиторами синтеза белка и РНК. Промежуточная память (или процесс консолидации), по-видимому, сопровождается синтезом специфических макромолекул и продолжением реверберации импульсов и длится, начиная с 10-й миллисекунды после воздействия, до нескольких часов. Этот процесс подавляется ингибиторами синтеза белка и РНК и частично блокаторами проведения в синапсах. Долговременная память как результат стойкого повышения проводимости синапсов длится от нескольких минут до нескольких часов после воздействия (максимальная продолжительность в течение всей жизни). Данный процесс обратимо подавляется некоторыми блокаторами синап-

тического проведения и ингибиторами синтеза белка. Поддержание долговременной памяти не связано с интенсивностью обмена белка и РНК.

Биохимические механизмы памяти заключаются в избирательном увеличении эффективности синаптической передачи, а именно в увеличении синтеза специфических белков и компонентов пре- и постсинаптических структур при обучении, запоминании; синтеза белков-коннекторов, своеобразных антител, способных избирательно связываться с определенными синапсами, в которых осуществляется процесс запоминания. С коннекторами при обучении связано межклеточное узнавание нейронов. Коннекторы являются маркерами тех или иных синапсов. Свойствами коннекторов обладают скотофобин (основной полипептид, состоящий из 15 аминокислот), способствующий привыканию к свету и темноте; гексапептид амелетин, способствующий привыканию к звуку у крыс, и N-концевой фрагмент АКТГ гипофиза (декапептид), увеличивающий продолжительность долговременной памяти. По мнению И. П. Ашмарина (1975), при обучении происходит избыточный синтез антигенов в пре- и пост-СМ и их выход в среду, возможно, в комплексе с РНК, где антигены, поступающие в астроциты (лимфоцитоподобные клетки), участвуют в синтезе антител-коннекторов. Антитела выходят из нейроглии и контактируют с пре- или пост-СМ при участии еще одного синаптического фактора — комплемента. Таким образом, при долговременной памяти происходит иммунологическая реакция межклеточного синаптического узнавания. Определенное значение в памяти придают нейроспецифическим белкам, в частности белку S-100, в системе нейрон — синапс — глия. Предполагается, что белок S-100 является эффектором, инактивирующим репрессор в нейронах, и процесс, будучи однажды «запущенным» (при обучении), обеспечивает стабильность обмена веществ, обеспечивающих долговременную память. Роль обмена в нейроглии в механизмах памяти отражена в гипотезе о клеточном делении сателлитных клеток нейронов при обучении, направляющих конуса роста нейронов к определенным эффекторным клеткам, и в гипотезе А. И. Ройтбака (1973) о миелинизации определенных аксонов при обучении, приводящей к повышению эффективности синаптической передачи.

## ОБРАТНЫЕ СИНАПТИЧЕСКИЕ СВЯЗИ

Надежность синаптической передачи обусловлена, с одной стороны, возможностью саморегуляции синапса, основанной как на прямых, так и на обратных связях при секреции медиатора, и, с другой — на прямых и обратных трофических связях (Д. П. Матюшкин, 1975). Например, проторение синаптических

путей при обучении, посттетаническую потенцию (облегчение) в ЦНС и нервно-мышечных синапсах трудно объяснить без учета положительных обратных транссинаптических влияний.

Наибольший интерес представляют данные об обратной транссинаптической связи при помощи  $K^+$ , поскольку такая регуляция наблюдается в любых возбуждающих периферических и центральных синапсах. В этих случаях накопление  $K^+$  в синаптической щели является следствием деполяризации пост-СМ и в гораздо меньшей степени деполяризации терминалей. Действие  $K^+$  на вызванную путем стимуляции электрическим током секрецию ацетилхолина в нервно-мышечных синапсах осуществляется по-разному. При кратковременной стимуляции токами низкой частоты калиевая обратная связь может проявляться в качестве положительной, способствующей потенциации секреции. При длительной стимуляции токами высокой частоты (в синаптической щели накапливается значительное количество  $K^+$ ) действие этой связи двухфазное — сначала положительное, а затем отрицательное. Ослабление секреции ацетилхолина под действием высоких концентраций  $K^+$  обеспечивает саморегуляцию в системе и стабилизацию уровня секреции и концентрации  $K^+$  в синаптической щели: увеличение секреции ацетилхолина → возрастание  $[K^+]_o$  в щели → снижение секреции → снижение степени деполяризации пост-СМ и уменьшение  $[K^+]_o$  в щели до определенной концентрации, которая все же потенцирует увеличение квантовой секреции и т. д. При длительной и высокочастотной стимуляции отрицательная калиевая обратная связь приводит к полному или частичному пре-синаптическому блоку. Таким образом, характер проявления калиевой обратной связи зависит от частоты проведения импульса. Однако в лишенной калия среде посттетаническая потенция может исчезать совсем. Калиевая обратная связь увеличивает надежность синаптической передачи, потенцируя секрецию в ходе текущей умеренной активности, а при функциональной перегрузке сохраняя систему для последующей работы посредством ее автоматического выключения. В ЦНС такая обратная связь может определять ранние этапы формирования временной связи между нейронами. В осуществлении обратных синаптических связей большую роль могут играть также простагландины и медиаторы.

## ТРАНССИНАПТИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ СИНТЕЗА БЕЛКА И РНК

Как известно, основными регуляторами биосинтеза белка и РНК в нервной ткани при внесинаптической активации могут быть ионы ( $Ca^{++}$ ,  $K^+$  и  $Na^+$ ) и их соотношение в нейронах. При синаптической активации этими регуляторами являются не

только ионы, но и медиаторы, действие которых опосредовано через систему цАМФ. Синтез белка в нервной ткани очень чувствителен к изменению ионного состава. Внесинаптическая активация или генерация потенциала действия, как правило, не изменяет значительно процессы биосинтеза в нейронах. Транссинаптическая регуляция биосинтеза белка и РНК в нейронах является важным свойством нервной системы (Weight, 1971). Изменения биосинтеза белка и РНК в постсинаптических структурах при действии медиаторов направлены на различные звенья: ресинтез специфических белков необходим для повышения эффективности синаптической передачи, кодирования информации и репаративных трофических процессов (В. Я. Бродский, 1966). Последние отличаются следующими особенностями: изменение обмена РНК более чувствительно к транссинаптическому действию медиаторов, чем изменения обмена белков и ресинтез «расходуемых» белков при функционировании нейронов; нередко усиление синтеза РНК в возбужденном нейроне может быть компенсаторным, т. е. возникать в ответ на усиленный катаболизм белков (Б. Н. Вепринцев, 1971). По данным Peterson, Egulka (1973), при сравнении РНК нейронов аплизии с РНК гонад общими оказываются 92% (по данным гибридизации). Таким образом, только 8% общего количества РНК является специфическим для нейронов, из которых только половина используется при функциональной активности. В процессе транссинаптической стимуляции, когда усиливается процесс транскрипции, образуются новые молекулы РНК, хотя одновременно могут быть использованы и специфические.

Основываясь на данных ряда авторов (Ю. Я. Гейнисман, 1974), было бы опрометчиво делать вывод о том, что при ВПСП наблюдается усиление, а при ТПСП — угнетение биосинтеза РНК и белков. Пока ясно одно, что обмен как при возбуждении, так и при торможении нейронов достаточно интенсивен. Процессы возбуждения и торможения как бы дополняют друг друга, оказывая влияние на разные стороны обмена РНК и белков. Оба процесса в совокупности повышают пластический потенциал функционирующего нейрона, который испытывает различные влияния со стороны других нейронов. Учитывая, что распад белков и РНК в основном определяется влиянием внешней среды, изменением ионного баланса и т. д., а биосинтез контролируется преимущественно генетическим аппаратом, следует иметь в виду, что протеазы и РНК-азы нейронов очень чувствительны к функциональным изменениям нервной системы.

Различные способы деполяризации нейронов и эффекты медиаторов могут иметь в зависимости от объекта, условий и т. д. различный знак метаболического ответа (Р. Н. Глебов и др., 1971; В. Х. Тихонов и др., 1973). Особенно это касается ткани мозга, содержащей различные популяции нервных окончаний

с возбуждающими и тормозящими синапсами. Известно, что взаимодействие медиаторов с пост-СМ эффекторных клеток каким-то образом изменяет процессы транскрипции и трансляции.

## СИНАПС И НЕПРОГЛИЯ

Глиоциты непосредственно не принимают участия в синаптической передаче. В синаптической щели нет отростков этих клеток. Однако отростки астроцитов диаметром до 50 нм, олигодендроглиоцитов и тела глиоцитов могут изолировать (инкапсулировать) синапсы, разделяя их и разобщая пре- и постсинаптические структуры от соседних элементов. Если учесть избирательную проницаемость нейроглии для  $K^+$ , высокую активность глиальной Na,K-АТФ-азы, то опосредованная функция нейроглии в отношении синапсов сводится к выведению избыточного внеклеточного K, накапливающегося при деполяризации аксонов, нервных окончаний и пост-СМ, стабилизации концентрации  $K^+$  во внеклеточной среде и синаптической щели. Сопротивление глиальной мембраны в 10—100 раз ниже сопротивления клеточной мембраны нейрона, т. е. ионы легко могут проникать через нейроглию.

ТМП глии более чувствителен к изменению концентрации внеклеточного K в физиологических концентрациях, чем нейрональный ТМП. Эти свойства делают нейроглию регулятором ионного состава среды, уникальным калиевым буфером, а значит, и регулятором ТМП нейронов. Например, при эпилептиформных судорогах нарушена защитная функция глии (Syrett, Ward, 1971), которая в норме предотвращает избыточное накопление  $K^+$  в синаптической щели. Может быть именно это расстройство позволяет избыточной концентрации  $K^+$  деполяризовать соседние нейроны и тем самым создавать очаг гиперактивных нейронов. Существует предположение (Baylor, Nicholls, 1969), что глия выделяет и интегрирует некоторые отростки нейронов в группы, которые могут работать в определенном синхронизированном режиме при помощи деполяризующего воздействия внеклеточного  $K^+$ . Нейроглия, окружающая синапс, может также препятствовать диффузии медиаторов в межклеточное пространство, аккумулировать отработанные медиаторы. Олигодендроглиоциты вызывают образование миелина, покрывающего крупные нервные волокна, и тем самым влияют на проведение импульса по нерву, а значит, и через синапс. При дегенерации аксонов сателлитная глия способна фагоцитировать содержимое терминалей. Леммоциты направляют рост нервных волокон, регенерирующих после повреждения. Образованию коллатералей от основного нервного ствола предшествует митоз леммоцита (Speidel, 1964). Для объясне-



ния функции глии как вектора конуса роста нервов и претерминалей, особенно в периферической нервной системе, необходимо признать наличие обратных метаболических связей между нейроглией и нервом.

Цикличность процессов в системе нейрон — нейроглия и гипотеза о транспорте веществ из глии в нейрон. Сопряженность изменений интенсивности энергетических и биосинтетических процессов в нейроглии и нейроне позволила Hyden в 1959—1966 гг. предложить гипотезу о существовании единой саморегулирующейся метаболической системы нейрон — нейроглия. Многочисленные данные (Л. З. Певзнер, 1972) указывают на цикличность и реципрокность обмена РНК и белка в системе нейрон — нейроглия при физиологических состояниях. При возбуждении нервной системы регуляторные функции, по-видимому, выполняют попеременно синтетический аппарат нейрона и нейроглии. Во время осуществления регуляторной функции нейронами в глии происходит накопление энергии. После использования нейроном всей информации стабильных матриц он направляет свою деятельность на восстановление собственных ресурсов. В этот момент регуляторные функции выполняют синтетический аппарат глии. Эти циклы проявляются в виде двух фаз: фазы снижения интенсивности обмена в глии и фазы нормализации содержания РНК и белка, в некоторых случаях усиления их синтеза в глии по сравнению с нормой.

Снижение количества РНК в глии при длительной активности нейрона можно объяснить транспортом РНК из глии в нейрон. В некоторых участках нервной ткани может происходить перераспределение РНК между клеточными структурами без существенных изменений суммарного ее количества в ткани. Указанные изменения содержания РНК в ответ на внешнее физиологическое воздействие проявляются скоро после начала этого воздействия и даже на фоне действия ингибитора синтеза РНК, что является доказательством правильности гипотезы о транспорте макромолекул из глии в нейрон, но не о преобладании быстрых и резких изменений в биосинтезе и распаде РНК. На определенном этапе возбуждения ЦНС восстановление расходуемых ферментов и белков нейрона уже не обеспечивается ресинтезом, в этих условиях нейрон выступает в роли акцептора РНК (и других веществ), а нейроглия — в роли донора. При гиперфункции нейрон в отличие от глии увеличивает скорость потребления кислорода; в глии в это время может происходить частичный переход на анаэробный гликолиз для компенсации возросшей потребности в энергии. Таким образом, первая фаза циклических изменений в системе нейрон — глия может соответствовать транспорту макромолекул типа РНК из глии в активно функционирующий нейрон, а вторая фаза — синтезу макромолекул в глии, т. е. глия берет на себя функцию истощенных нейронов. Напомним, что активация нейронов

при длительных функциональных нагрузках нередко сопровождается увеличением количества сателлитов вокруг интенсивно работающего нейрона без изменения общего числа глиоцитов. При активации нейронов в них повышаются интенсивность энергетических процессов, содержание РНК и интенсивность ее синтеза, а в глии возникают, как правило, противоположные процессы. При торможении нейронов отмечаются обратные отношения, которые выражаются в усилении энергетического потенциала всей системы нейрон — глиа в основном за счет усиления энергетических и обменных процессов в глии.

По-видимому, кроме РНК и белков, из глии в нейрон могут транспортироваться и другие метаболиты, в частности глюкоза, электролиты, аминокислоты. Окружающие аксон клетки глии (в основном олигодендроэпителии в центральных синапсах или астроциты в периферических синапсах) содержат в 70 раз больше митохондрий, чем аксоплазма. Имеются доказательства транспорта аминокислот из клеток глии в нейрон, зависящего от  $[K^+]_o$  (Lodin et al., 1971). В целом гипотеза о транспорте веществ из глии в нейрон и, наоборот, из нейрона в глию пока еще экспериментально не доказана.

Транспортируемые из глии в нейрон или аксон макромолекулы необходимы не только для регуляции процессов в теле нейрона, но и для энергетического обеспечения аксоглия и локального синтеза белка и РНК в аксоне. Таким образом, активность глии является важным специфическим показателем функциональной активности синапсов, поскольку именно возбуждение нервных окончаний является как бы сигналом к активации глии.

**Транссинаптическая деполяризация глии.** ТМП глиальных клеток в покое составляет 80—90 мВ, т. е. выше, чем у нейронов (около 70 мВ). Глиоциты способны медленно (от 150—500 мс до 4—5 мин) деполяризоваться (снижение ТМП до 40 мВ). После деполяризации ТМП также медленно возвращается к нормальному уровню, проходя стадию гиперполяризации. При длительной стимуляции аксонов  $[K^+]_o$  может повышаться довольно значительно (от 3 до 10—15 мМ). Ионы калия способны деполяризовать глию (Kuffler, 1967) и тем самым ее активировать (рис. 19). Аккумуляция глиоцитами  $K^+$  сопровождается медленной деполяризацией. С другой стороны, деполяризация глии приводит к выходу  $K^+$  в межклеточную среду. Как объяснить этот парадокс? Накапливающиеся в среде при возбуждении нейронов  $K^+$  вызывают деполяризацию глии и результирующий ток переносит их через электрические глио-глиальные контакты в область с низкой концентрацией внеклеточного калия. В этом случае, как мы уже упоминали, глиа выступает в роли своеобразного калиевого буфера. Внеклеточный  $K^+$  пассивно или активно транспортирующийся по глиальным путям к другому нейрону, деполяризует его. Предположение

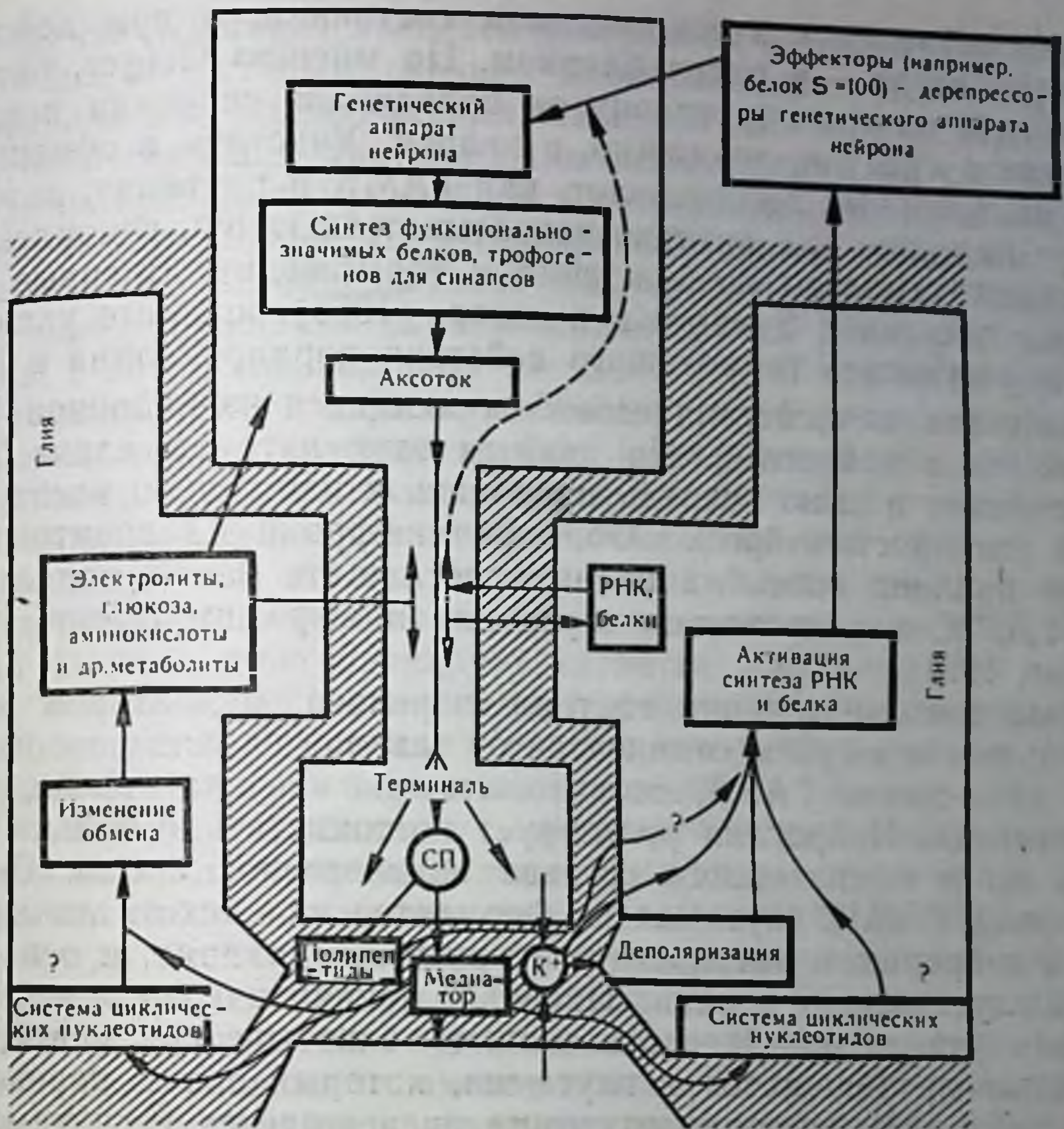


Рис. 19. Обратные связи в системе нейрон—синапс—нейроглия.

о возможности активного транспорта  $K^+$  из среды в глию основано на обнаружении высокой по сравнению с нейронами активности  $Na, K$ -АТФ-азы (Cummins, Hyden, 1962). Деполаризаторами глии могут быть не только  $K^+$ , но и внеклеточные (свободные) медиаторы, например ацетилхолин и ГАМК (Н. Г. Алексидзе, 1974). Вся поверхность клеточной мембраны глиоцитов в отличие от нейрональной, вероятно, химически возбуждима. Пока не ясно, участвует ли система циклических нуклеотидов в медиаторной деполаризации глии при изменениях обмена. Калиевая деполаризация глии существенно изменяет уровень обмена, в частности значительно увеличивает интенсивность дыхания. Изменение объема клеток (сморщивание) при калиевой деполаризации может служить основой для выталкивания макромолекул во внеклеточную среду в области контакта с нейроном. В тканевой культуре глиоцитов отмечается двигательная, ритмическая активность (Geiger, 1963). Усиливают эту активность адреналин, ацетилхолин, раздражение электрическим током; ослабляют — наркотики, совсем прекращают — серотонин и норадреналин, причем при действии серотонина

клетки оставались в сокращенном состоянии, а при действии норадреналина — в расслабленном. По мнению Geiger, при сокращении олигодендроглиоцитов происходит секреция веществ из глии в среду и, возможно, в нейрон. Участвуя в обмене таких медиаторных аминокислот, как ГАМК и глутамат, которые могут пассивно или активно захватываться глией, глиоциты регулируют процессы возбуждения и торможения. Впервые этот вопрос поставлен Svætichin и соавт. (1965), которые указывали на регуляцию тормозящего действия норадреналина в ЦНС посредством воздействия высвобождающихся из нейронов  $\text{NH}_4^+$  на обмен в нейроглии. По данным этих авторов, сдвиг ТМГ глии может в свою очередь приводить к изменению электрической активности нейронов. Обогащенная фракция глиоцитов коры мозга кролика способна активно поглощать такие медиаторы, как ГАМК, норадреналин, серотонин и дофамин (Hepp, Hamburger, 1971).

Высокоизбирательная система переноса медиаторов через глиальные мембраны отличается от таковой синапсом, например поглощение ГАМК синапсомами в 3 раза выше, чем глиоцитами. Нейроглия регулирует постоянство не только ионного, но и медиаторного состава внеклеточной среды. Основной фонд ГАМК, глутамата и ферментов их синтеза локализован в нейронах, в частности в нервных окончаниях, а основной фонд глутамина — в глии. После постсинаптического действия часть глутаминовой кислоты может захватываться глией, где глутамат превращается в глутамин, который затем переносится в нейрон. В нейронах глутамин превращается в глутамат, в ходе реакции высвобождается аммиак, который (в форме  $\text{NH}_4^+$ ) может регулировать обмен аминокислот в системе нейрон — глия. По мнению Лабори (1974), причину психозов следует искать в нарушении обратных связей в системе нейрон — глия при деполяризации медиаторами глиоцитов. Медленную фазу сна автор объясняет деполяризацией глии, а парадоксальную фазу — активацией нейронов  $\text{Na}^+$ , диффундирующими из глии.

Рассмотрим возможную общую схему (см. рис. 19) обратных связей в системе нейрон — глия (И. П. Ашмарин, 1975; Tower, 1973), состоящую из следующих процессов: а) возбуждение нейронов и накопление  $\text{K}^+$  в среде; б) медленная калиевая деполяризация глии и захват  $\text{K}^+$  и медиаторов глиоцитами; в) увеличение уровня энергетических процессов в глии, активация биосинтеза на уровне транскрипции и трансляции вследствие длительной активации глии; г) транспорт необходимых макромолекул из глии в нейрон, компенсаторная регуляция процессов в теле нейрона, в аксоне и терминалях.

При изучении денервации периферических нервов было показано (Miledi, 1975), что леммоциты фагоцитируют нервные окончания в мышечных волокнах, однако миниатюрный потенциал можно зарегистрировать. Этот феномен авторы объясня-

ют тем, что леммоцит является источником высвобождения ацетилхолина, с которым связано происхождение миниатюрного потенциала в денервированных концевых пластинках. При этом квантовая секреция ацетилхолина леммоцитами не сопряжена с их деполяризацией. Способность к выделению квантов ацетилхолина в этом случае является приобретенным свойством леммоцита, и оно не определяется тем, что эти клетки захватили ранее сформированные запасы медиатора из дегенерирующего аксона, а затем освобождают их. Дело в том, что после дегенерации двигательных нервных окончаний и их фагоцитоза глией наступает период «электрического молчания» и только затем проявляется описанная выше своеобразная синаптическая реакция леммоцитов. Анализ показал, что конечный эффект обусловлен индукцией синтеза молекул холин-ацетилтрансферазы и других белков в леммоцитах денервированного аксона. Актиномицин D полностью блокирует развитие миниатюрного потенциала леммоцитами, не изменяя чувствительности холинорецепторов мышечной мембраны к ацетилхолину. При этом возникает новый этап в цепи обратных отношений в системе нейрон — глия. Леммоцит обладает генетически детерминированной способностью синтезировать и выделять ацетилхолин в виде квантов, но эта способность репрессирована каким-то фактором в аксоне. Когда аксон дегенерирует, то репрессор исчезает, леммоцит индуцирует синтез специфической РНК, участвует в производстве и выделении ацетилхолина. Другими словами, в нормальных условиях из аксона в леммоциты может поступать репрессор генетического аппарата, сдерживающий фагоцитирующую способность сателлитных клеток.

**Глиапы.** Наиболее уязвимым моментом в рассмотренной выше схеме является механизм транспорта макромолекул из глии в нейрон. В месте непосредственного контакта аксона с окружающей его глией нет уплотнения мембран, скопления пузырьков. Участок контакта представляет собой глиапс — место транспорта макромолекул (В. Н. Шелихов и др., 1975). Механизмы транспорта пока не ясны, не исключена возможность, что он осуществляется путем пиноцитоза. По данным Svaetichin и соавт. (1965), в участках глиапса в сетчатке гистохимически обнаружена высокая активность дыхательных ферментов. В настоящее время делаются попытки дифференцировать глиапсы на химические и электрические. Химические глиапсы толщиной 15—20 нм образуются при контакте коллатералей аксона с телами (или отростками) смежных сателлитных клеток глии. Электрические глиапсы толщиной до 4—6 нм, обладающие очень малым сопротивлением, образуются не только при контакте глиа — нейрон, но и при контакте глиа — глиа. В области контакта не обнаружено утолщений мембран. Через глиапсы может осуществляться прямая и обратная связь между проведением возбуждения в системе нейрон — глия.

## ЧАСТЬ III. БИОХИМИЯ МЕДИАТОРНЫХ СИСТЕМ

### 10. Биохимия холинергических синапсов

---

#### РЕГИОНАЛЬНОЕ И СУБКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА

Впервые медиаторную функцию ацетилхолина удалось показать на блуждающем нерве изолированного сердца лягушки Löwi в 1921 г. В настоящее время к холинергическим нейронам, секретирующим ацетилхолин и образующим синаптические контакты, относят спинальные мотонейроны, оканчивающиеся на вставочных нейронах или на скелетных мышцах позвоночных; парасимпатические постганглионарные нейроны, оканчивающиеся на гладких мышцах (например, в сердце); симпатические и парасимпатические преганглионарные нейроны; нейроны ствола, зрительного бугра и среднего мозга (Д. А. Сахаров, 1974; Krnjević, 1974). Отсутствие гистохимических методов идентификации ацетилхолина не позволяет четко локализовать холинергические нейроны в ЦНС. Холинреактивные структуры обычно обнаруживают по реакции холинорецепторов и ацетилхолинэстеразы, хотя в последнем случае одно лишь выявление активности фермента не всегда соответствует холинреактивности данной структуры.

В мозге млекопитающих количество холинергических нейронов по отношению

к общему числу нейронов с другой медиаторной специфичностью составляет менее 10—15%. Существует два метода определения ацетилхолина: биологический (по степени сокращения мышц) и высокочувствительный, хотя и трудоемкий, метод газовой хроматографии. Максимальное содержание ацетилхолина в мозге обнаруживается в стволе и хвостом ядре, меньше его — в коре, варолиевом мосту и продолговатом мозге, менее всего — в мозжечке. Ацетилхолин широко распространен в живой природе, встречается и в лишенных нервов тканях. Синапсы холинергической природы обнаруживают не только у позвоночных (эффекторные, двигательные нейроны), но и у членистоногих (чувствительные и ассоциативные нейроны), у моллюсков.

В мозге выявлено три основных фонда ацетилхолина. Первый фонд составляет свободный ацетилхолин (20—25%). Он обнаруживается (иногда увеличивается до определенной величины) в присутствии ингибиторов ацетилхолинэстеразы и представляет собой истинно свободный ацетилхолин, находящийся в синаптической щели, а также ацетилхолин, находящийся в телах нейронов или в аксоплазме. Интересно, что около 15% синтезированного по ходу седалищного нерва ацетилхолина поступает в терминали с быстрым аксотоком (Dählström et al., 1974).

При дифференциальном фракционировании ткани мозга установлено, что 75—80% ацетилхолина определяется в синаптосомах (Whittaker, 1965, 1973). После разрушения синапсом при помощи осмотического шока выявляются два других фонда медиатора. Второй фонд — стационарный, лабильно связанный ацетилхолин, который находится в свободном виде или в виде комплексов с белками в цитозоле нервных окончаний. Эта часть ацетилхолина в терминалях (около 20—40% всего медиатора нервных окончаний) представляет собой продукт текущего синтеза, еще не вошедший в состав СП. Третий фонд состоит из депонированного, стабильно связанного ацетилхолина, локализованного в СП, который составляет около 60—80% всего ацетилхолина нервных окончаний. Так как СП представляет собой небольшую часть общего объема синапсом, содержание ацетилхолина в них в 25—30 раз больше, чем в цитозоле терминалей.

Достаточно широкая вариабельность количества свободного ацетилхолина в синаптосомах может объясняться также частичным выходом его из СП в процессе выделения. Накопление избытка свободного ацетилхолина в терминалях (например, при действии ингибиторов ацетилхолинэстеразы) не приводит к увеличению секретлируемого ацетилхолина (Potter, 1970).

На основании того, что популяция СП в одном и том же холинергическом нервном окончании может быть гетерогенной (часть светлых СП может быть окаймлена филаментами либо

ассоциирована с другими пузырьками) и не весь запас ацетилхолина секретруется при длительной стимуляции, было высказано предположение о различных состояниях ацетилхолина в тех или иных СП в зависимости от их расположения по отношению к активной зоне. В связи с этим везикулярный ацетилхолин состоит в свою очередь из 2—3 фондов: а) готового к секреции ацетилхолина, нередко включающего также только что синтезированный медиатор и располагающегося в непосредственной близости от активной зоны; б) мобилизационного, резервного фонда ацетилхолина, способного, но еще не готового к секреции, расположенного далеко от активной зоны СП и находящегося в равновесии с первым фондом; в) стабильного фонда (до 15%), не освобождаемого даже при длительной деполяризации в условиях блокады синтеза. Возможно, что стабильный фонд представляют собой СП, находящиеся в аксоплазме и мигрирующие с аксоотоксом.

Может ли свободный цитоплазматический ацетилхолин секретироваться в синаптическую щель в физиологических условиях? По-видимому, нет. Однако в некоторых экспериментах удалось выявить секрецию ацетилхолина в среду, похожую на выход свободного медиатора из цитоплазмы терминалей. Секрецию ацетилхолина в среду терминалями нервно-мышечных синапсов лягушки наблюдали у «истощенных» нервных окончаний, т. е. после предварительной стимуляции и добавления ингибитора захвата холина (Сессагелли, Нурлбут, 1975). При калиевой деполяризации синапсом коры мозга морской свинки высвобождение вновь синтезированного ацетилхолина было большим, чем убыль ресинтезированного из СП (Вакер, 1975). Автор объясняет такую аномалию не только возможностью выброса цитозольного свободного медиатора, но также возможным усилением при возбуждении скорости захвата ацетилхолина в СП из цитозоля нервных окончаний.

Относительное постоянство величины депонированного запаса ацетилхолина в СП определяется взаимоотношением ряда факторов: скоростью ресинтеза медиатора в цитоплазме; скоростью аккумуляции ацетилхолина в СП; скоростью секреции при деполяризации; возможностью синтеза ацетилхолина в пузырьках; скоростью гидролиза избытка свободного ацетилхолина (что возможно не во всех синапсах) при помощи ацетилхолинэстеразы пре-СМ. Известно, что вновь синтезированный ацетилхолин (после захвата терминалями холина) может сразу же секретироваться нервными окончаниями (Collier, Katz, 1971). Эти опыты свидетельствуют о том, что везикулярный ацетилхолин, готовый к секреции, пополняется не только путем мобилизации уже сформировавшихся квантов, но и за счет срочного ресинтеза медиатора в СП, расположенных вблизи от пре-СМ. Считается, что секреция вновь синтезированного ацетилхолина зависит от эффективности системы обратного захвата холина.



При калиевой деполяризации срезов мозга в СП происходит снижение содержания, вновь синтезированного ацетилхолина (Richter, Marchbanks, 1971).

Представления о везикулярном ацетилхолине, готовом для секреции, созданные Birks, McIntosh (1961), включают и предположение, что секреция его происходит из ограниченного запаса депонированного медиатора, который пополняется медленнее, чем расходуется. Вторым важным моментом является идея о мобилизации части СП, т. е. переходе уже синтезированных квантов ацетилхолина к пре-СМ, откуда они легко могут освобождаться при проведении нервного импульса. Переход СП на активные позиции может регулироваться скоростью аксотока, усилением диффузии СП, запускаемой  $Ca^{++}$  при деполяризации, скоростью упаковки, связывания ацетилхолина внутри СП при помощи определенных компонентов.

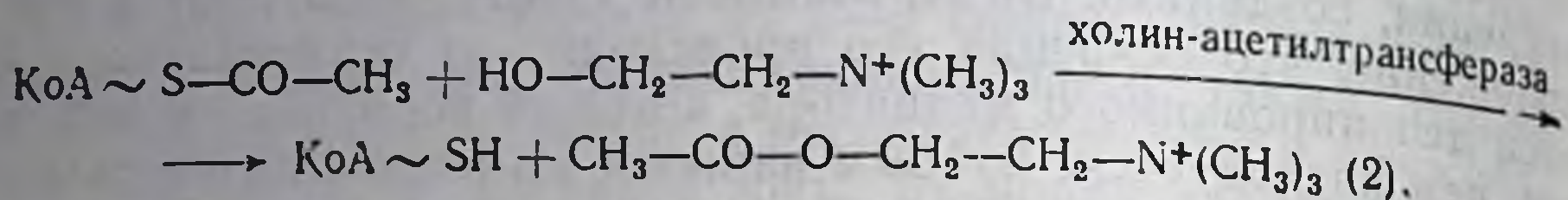
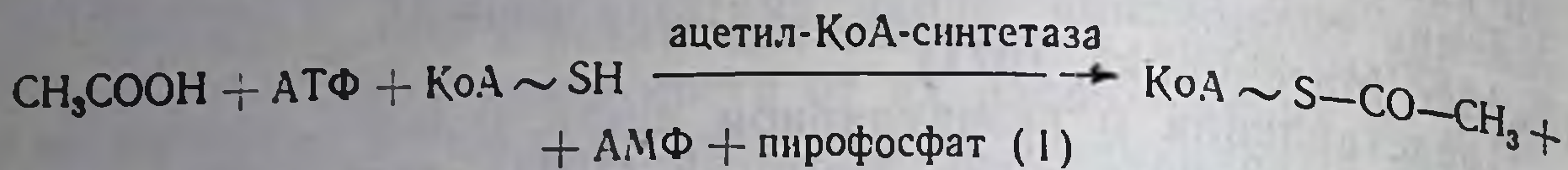
При длительной синаптической стимуляции запасы ацетилхолина быстро истощаются в начале стимуляции, а затем секреция его стабилизируется на более низком уровне (Hubbard, 1973). Такой феномен объясняется наличием особой фракции везикулярного ацетилхолина, которая ввиду близости к активной зоне более всего доступна для секреции и постоянно восполняется из основного запаса. Надо признать, что еще не все доказано в гипотезе о наличии нескольких фондов везикулярного ацетилхолина. Это видно, например, из противоречивых данных о локализации секреторирующегося новообразованного ацетилхолина.

## БИОСИНТЕЗ АЦЕТИЛХОЛИНА

Для синтеза ацетилхолина нервная ткань получает холин извне, поскольку он в мозге практически не синтезируется и поступает туда из крови через гематоэнцефалический барьер. Часть холина используется для ресинтеза лецитина и убихинона, другая часть в холинергических нейронах — для синтеза ацетилхолина. Внутриклеточное содержание холина в ткани мозга составляет больше 50%, остальная часть холина захватывается терминалями из синаптической щели после гидролиза и используется повторно. Захваченный холинергическими терминалями холин (60—72%) сразу превращается в ацетилхолин (Bagker et al., 1975).

Биосинтез холина осуществляется путем метилирования N-диметиламиноэтанола, синтезируемого из серина. Интенсивность синтеза ацетилхолина в нервной ткани резко снижается при удалении поджелудочной железы. Гормон этой железы — липокаин регулирует синтез холина. Холин-ацетилтрансфераза, катализирующая синтез ацетилхолина из холина и ацетил-КоА, была открыта в мозге в 1943 г.

Синтез ацетилхолина протекает в два этапа:



Первая реакция осуществляется в митохондриях, и лишь незначительная часть ацетил-КоА-синтетазы обнаружена в цитозоле, а донаторами ацетильных групп являются ацетат, пируват, цитрат, сукцинат, ацетилфосфат, О-ацетил-карнитин и др. В мозге позвоночных наиболее эффективным субстратом является цитрат, а наименее эффективным — пируват, в мозге беспозвоночных — ацетат. По данным Тисек (1967), в синапсосомах хвостатого ядра мозга овцы синтез ацетил-КоА из цитрата происходит в цитоплазме, в то время как синтез ацетил-КоА из ацетата идет в основном в синаптических митохондриях, при этом синтез ацетилхолина из цитрата происходит более интенсивно, чем из ацетата. Образование ацетилхолина в мозге зависит от обмена глутамата, его превращения в цикле Кребса в цитрат или пируват. Пока неизвестно, как осуществляется транспорт ацетил-КоА из митохондрий к месту синтеза ацетилхолина. Интенсивность синтеза ацетилхолина и его секреция значительно снижаются при нарушении окислительного фосфорилирования, вызывающем быстрое уменьшение запасов АТФ в нервном окончании (Beani et al., 1966). Уровень секреции ацетилхолина уменьшается при нарушении регуляции его синтеза, вызванной блокированием обратного захвата холина.

Перенос ацетильного остатка с ацетил-КоА на холин осуществляется холин-ацетилтрансферазой в нервных окончаниях. Наибольшая активность этого фермента в мозге животных определяется в хвостатом ядре, подбугорной области, базальных ганглиях и коленчатых телах, менее выраженная — в коре головного мозга и мозжечке. Региональное распределение фермента в мозге в целом совпадает с уровнем ацетилхолина. Холин-ацетилтрансфераза является ферментом преимущественно нервной ткани, однако она обнаружена также в мышцах, плаценте, эритроцитах и селезенке. Около 70% активности этого фермента в мозге связано с синапсосомами, остальная часть приходится на цитоплазматическую фракцию. Холин-ацетилтрансфераза является цитозольным ферментом и в нервных окончаниях любых холинергических нервов находится, как правило, в цитоплазме (Csillik et al., 1970). Обнаружение активности фермента частично в СП или в синаптических мембранах может быть связано с загрязнением в процессе выделения (Фоппит, 1968). Гистохимически изучено распределение активности холин-ацетил-

трансферазы в боковых корешках спинного мозга крыс (Kasa et al., 1970). Она выявлена в комплексе цитоплазматическая сеть — рибосомы перикариона, где осуществляется ее синтез. В аксонах активность холин-ацетилтрансферазы обнаружена в нейрофиламентах, что связано с миграцией этого фермента с аксоотомом, и в отличие от ацетилхолинэстеразы не выявлена в нервных трубочках. Активность фермента определена главным образом в цитоплазме терминалей, а также частично на мембранах СП, в очень небольшом количестве — в аксолемме и совсем отсутствовала в митохондриях.

Субстратная специфичность холин-ацетилтрансферазы мозга позвоночных невысока. Особая роль в каталитическом действии фермента принадлежит третьей  $\text{CH}_3$ -группе холина. Ацетил-КоА-синтетаза также малоспецифична. Этот фермент умеренно катализирует образование эфиров холина с остатками простых алифатических кислот. Синтез ацетилхолина из фосфорилхолина или ЦДФ-холина представляется маловероятным.

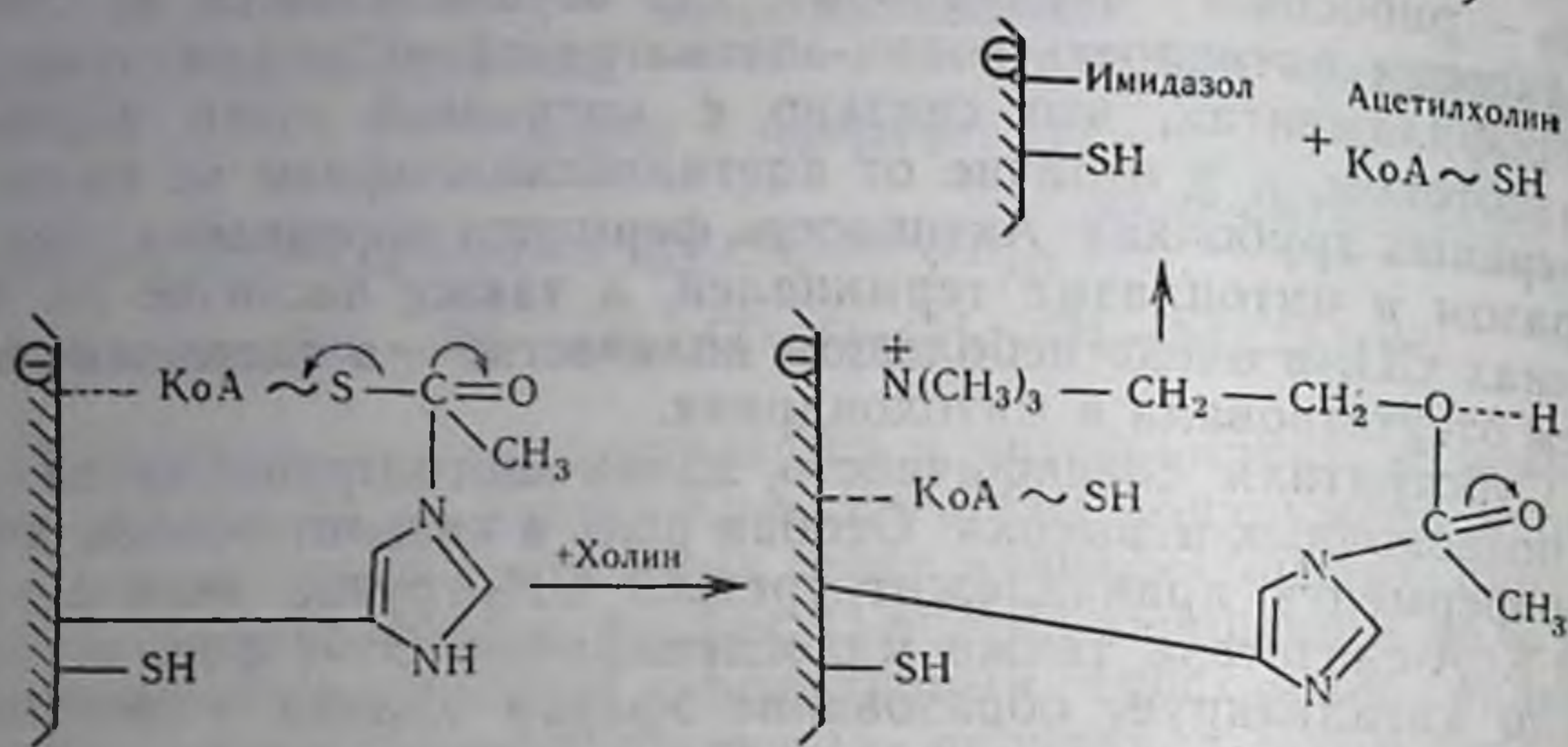
Синтез ацетилхолина ингибируют тиоловые реагенты,  $\text{Cu}^{++}$ , некоторые  $\alpha$ -кетокислоты, особенно  $\alpha$ -кетоглутарат, а также моноацетат. Специфическими ингибиторами очищенной холин-ацетилтрансферазы являются производные нафтохинона, производные флавоноидов — препарат морин (2,3,4,5,7-пентагидрофлавонон) и 4-(3-хлорфенилвинил)-пиридин, легко проникающий через гематоэнцефалический барьер. Для торможения холин-ацетилтрансферазы используют часто гемихолин-3 ( $\alpha, \alpha'$ -диметилэтанол-амино-4,4'-бутерофенон), который конкурирует с холином за активный центр фермента (Bowman, Marshall, 1972). Способностью тормозить синтез ацетилхолина обладают также большие концентрации эзерина и прозерина, никотин и тубокурарин.

Оптимум рН фермента находится в пределах 7,0—8,5. Значение  $K_m$  для холина 0,1—20 мМ, для ацетил-КоА — 20 мМ. Фермент существует в трех молекулярных формах. Свойства холин-ацетилтрансферазы мозга и периферических нервов практически одинаковы. Очищенный фермент мозга имеет отн. мол. м.  $87 \cdot 10^3$  и состоит из 6 субъединиц (Chao, 1975). При рН 7,4 и в среде с высокой ионной силой холин-ацетилтрансфераза агрегирует, образуя комплекс с отн. мол. м. до  $4 \cdot 10^5$  (Vannys, 1976). В активном центре фермента находится имидазол — остаток гистидина, который акцептирует ацетильную группу ацетил-КоА и переносит ее на холин (схема 5).

Активность фермента электрического органа ската активируется  $\text{K}^+$  и низкими концентрациями  $\text{Ca}^{++}$  и угнетается  $\text{Na}^+$  (Natividade et al., 1972). Ацетилхолин способен в больших концентрациях ингибировать холин-ацетилтрансферазу мозга конкурентно по отношению к холину и неконкурентно по отношению к ацетил-КоА. КоА ингибирует фермент конкурентно по отношению к ацетил-КоА. Таким образом, синтез ацетилхолина

## Схема 5

Синтез ацетилхолина (по Malthé—Sorensen, 1976)<sup>1</sup>



регулируется изменением соотношений холина, ацетилхолина, КоА и ацетил-КоА.

Активность ацетилхолинэстеразы в мозге во много раз превышает активность холин-ацетилтрансферазы. По-видимому, синтез ацетилхолина протекает непрерывно, поддерживая постоянный уровень медиатора в терминалях. Синтез ацетилхолина регулируется частично цитозольным ферментом нервных окончаний — ацетил-КоА-гидролазой.

В ходе неонатального развития по мере образования синаптических контактов активность холин-ацетилтрансферазы возрастает, что указывает на обратную постсинаптическую регуляцию синтеза ацетилхолина в терминалях (Black et al., 1972). Образование ацетилхолина может контролироваться при длительной деполяризации терминалей, и эта регуляция состоит не только в том, что после прекращения импульсации в терминали активно поступает субстрат синтеза — холин, но и в том, что в ходе самой деполяризации активируется холин-ацетилтрансфераза. Известно, что содержание ацетилхолина и активность холин-ацетилтрансферазы в нервных окончаниях примерно в 100 раз выше, чем в нерве. Этого запаса достаточно, чтобы осуществить передачу нескольких тысяч импульсов. Однако в условиях продолжительного раздражения холинергических нервов запас медиатора в терминалях может быть относительно небольшим, но вследствие увеличения активности холин-ацетилтрансферазы его синтез протекает со скоростью, превышающей максимальную скорость секреции ацетилхолина. При стимуляции электрическим током (20 Гц, 5 мин) нерва диафрагмы

<sup>1</sup> Молекула фермента имеет 4 активных центра: 1) отрицательно заряженный — для взаимодействия с катионной головкой холина; 2) участок, акцентирующий ацетил-КоА; 3) имидазольное кольцо гистидина; 4) SH-группа — стабилизатор 3-го активного центра.

крыс синтез ацетилхолина увеличивается (Potter, 1970). В состоянии покоя в ганглиях синтезируется не более 20% общего запаса ацетилхолина. По данным de Bellegoche, Bradford (1972), при стимуляции электрическим током или при калиевой деполяризации синапсом коры мозга крыс происходит увеличение выброса ацетилхолина в среду на 45%, в то же время количество его в синапсомах уменьшается всего на 24%, т. е. возрастание общего содержания медиатора обусловлено увеличением его синтеза в ходе деполяризации.

#### ДЕПОНИРОВАНИЕ АЦЕТИЛХОЛИНА В СИНАПТИЧЕСКИХ ПУЗЫРЬКАХ

Пока трудно ответить на вопрос, где происходит синтез ацетилхолина в терминалях — исключительно в цитоплазме с последующей аккумуляцией медиатора в СП или частично (при определенных условиях) и в СП. Исследуя условия солиubilизации цитоплазматических ферментов синапсом, Foppit (1968) пришел к выводу, что часть холин-ацетилтрансферазы связана с мембранами СП. Это связывание обратимо, при физиологических значениях рН и ионной силы фермент находится в основном в растворимой форме. Синтез ацетилхолина из меченого холина осуществляется в СП мозга крыс (Ritchie, Goldberg, 1970). При этом связывание  $^{14}\text{C}$ -ацетилхолина СП составляет 1,5% от общего включения меченого ацетилхолина в синаптоплазму, а при инкубации синапсом с меченым холином в СП обнаруживается 15% общего количества вновь синтезированного медиатора. Анализ температурной зависимости связывания ацетилхолина и холина с СП позволил авторам предположить, что медиатор пассивно переносится в СП, а холин — при помощи активного транспорта для осуществления в СП синтеза ацетилхолина. Связывание  $^3\text{H}$ -холина с изолированными СП мозга блокируется триэтилхолином, а также гемихолином-3 (Hemsworth, Bosmann, 1971).

Приводятся также противоречивые данные, свидетельствующие о возможности аккумуляции синтезированного в синаптоплазме ацетилхолина в СП. По мере очистки фракции СП мозга активность холин-ацетилтрансферазы убывает (Tusek, 1966). В СП электрического органа ската ее активность не выявляется. Захват пузырьками ацетилхолина конкурентно угнетается в присутствии органических и неорганических катионов (Richter, Marchbanks, 1971). Ацетилхолин способен проникать в СП против градиента концентрации. Обмена меченого ацетилхолина, находящегося в синаптоплазме, с медиатором, локализованным в СП, практически не наблюдается. При инкубации синапсом коры мозга морских свинок с меченым холином ресинтез ацетилхолина обнаруживается в цитоплазме, а не в СП. По мне-

нию Kigijama и соавт. (1968), причиной замещения экзогенного ацетилхолина в СП является наличие в них высокоионизированных поланионных соединений. В основе поглощения ацетилхолина холинергическими СП электрических рыб лежит ионообменный механизм: оно зависит от наличия в среде  $\text{Na}^+$ , не зависит от присутствия АТФ и  $\text{Mg}^{++}$ , при этом 26% экзогенного ацетилхолина связывается СП необратимо, значение  $K_{дисс}$  равно 1,6 мкМ (Suszkiw, 1976; Mattson, O'Brien, 1976). Инкубация холинергических СП с меченым холином приводит к синтезу ацетилхолина, а последующая инкубация СП при рН 5,5 в присутствии  $\text{Ca}^{++}$  способствует высвобождению меченого медиатора (Magchbanks, Israel, 1972). Интерпретировать эти данные пока трудно, поскольку не ясно, высвобождается ли медиатор из СП (малообменивающийся фонд) или из лабильного фонда ацетилхолина, связанного с отрицательными группами на поверхности СП (Helle, 1973).

Ацетилхолин в СП находится в связанном виде, фармакологически неактивен и не расщепляется ацетилхолинэстеразой. Экзогенный меченый ацетилхолин не обменивается с везикулярным.

Различные формы СП встречаются даже в одном и том же нервном окончании, например холинергическом для электрического органа ската. Наряду с прозрачными секреторными СП в гораздо меньшем количестве обнаруживаются гранулы диаметром 80 нм, имеющие плотное содержимое диаметром 25 нм. Предполагают, что эти крупные СП не принимают участия в секреции ацетилхолина, они обнаруживаются не только в терминалях, но и в теле нейрона, а также по ходу аксона. Крупные холинергические СП могут содержать макромолекулы, необходимые для реконструкции секреторных холинергических СП.

В СП мозга млекопитающих и холинергических СП электрического органа ската выявлено также значительное количество связанного АТФ (Whittaker et al., 1974). АТФ достаточно прочно связан с компонентами СП, так как везикулярный фонд АТФ не обменивается с экзогенным  $^{14}\text{C}$ -АТФ, не удаляется при диализе и гель-фильтрации СП. Исследование взаимодействия ацетилхолина и АТФ в растворах при помощи ядерного магнитного резонанса указывает на образование их комплексов в соотношении 4 : 1 (Richard, Shagr, 1975).

При длительной инкубации СП коры мозга крыс в среде обнаруживаются растворимые белки, обладающие способностью связывать  $^{14}\text{C}$ -ацетилхолин (Matsuda et al., 1971). По данным Solleg и соавт. (1973), в СП коры мозга присутствуют растворимые кислые липопротеиды, содержащие связанные нуклеотиды. Их функция в СП, по мнению авторов, состоит в хранении медиаторов. Извлечь эти липопротеиды из СП можно только разрушением структуры детергентами и щелочными растворами. Из холинергических СП электрического органа рыб выделен

кислый белок — везикулин, который, связывая ацетилхолин внутри СП, возможно, электростатически препятствует его диффузии из СП (Whittaker, 1973). Содержание везикулина (по белку) в СП достигает 40%. У везикулина отн. мол. м.  $1 \cdot 10^4$ , в его состав входят прочно связанные адениловые нуклеотиды (7—8 молей на 1 моль белка), очевидно, АТФ. При инкубации СП с  $^{14}\text{C}$ -АТФ только 16% экзогенного АТФ обменивается с нуклеотидами везикулина. Возможно, что везикулин холинергических СП специфически реагирует с  $\text{ZnI}_2$  в присутствии  $\text{OsO}_4$  при фиксации тканей для электронно-микроскопического исследования. Везикулин локализован, по-видимому, внутри СП. В составе везикулина много кислых аминокислот, отличительным признаком его является также высокое содержание орнитина. По аминокислотному составу везикулин отличен от тубулина, белка S-100 и сходен с хромогранином и нейрофизинами — белками-спутниками катехоламинов и нейрогормонов. В гипертонических растворах везикулин диссоциирует на нуклеотиды и белок (в форме димера).

По мнению Whittaker, как и в случае гистамина, который в гранулах лаброцитов (тучные клетки) находится в форме своеобразной соли с кислым полисахаридом (гепарин), ацетилхолин в холинергических терминалях электрического органа рыб существует в СП в форме соли везикулината ацетилхолина, при этом на 1 моль везикулина, по расчетам автора, приходится 19 молей медиатора. Количество нуклеотидов в везикулине варьирует. В холинергических терминалях электрического органа ската существует две популяции СП, имеющие высокое (9,1—10,8) и низкое (4,3) соотношение ацетилхолина и АТФ. Первый тип СП при деполяризации быстрее истощает запасы медиатора, чем второй (Zimmerman, Whittaker, 1974). При деполяризации френико-диафрагмального нерва мышей 80% секретиремого ацетилхолина выбрасывается в связанной с полипептидом форме, по-видимому, с везикулином (Musick, Hubbard, 1972).

#### ОБРАТНЫЙ ЗАХВАТ ХОЛИНА ТЕРМИНАЛЯМИ

После постсинаптического действия ацетилхолин гидролизуеться при помощи ацетилхолинэстеразы до ацетата и холина; последний активно захватывается в синаптической щели холинергическими нервными окончаниями. Подробно изучены две системы транспорта холина срезами и синаптосомами мозга (полосатое тело, кора, морской конек) животных (Haga, 1971; Yamatiga, Snyder, 1973; Simon, Kuhag, 1976). Первая (захват-1) является системой активного транспорта холина через пре-СМ с низкой  $K_m$  ( $5 \cdot 10^{-6}$ — $6 \cdot 10^{-7}$  М), функционирует при низких концентрациях холина ( $10^{-4}$ — $10^{-7}$  М). Вторая (захват-2) является системой пассивного транспорта холина через любые нейрональные

мембраны с высоким значением  $K_m$  ( $10^{-4}$ — $10^{-5}$  М). Скорость пассивного переноса холина в 5—6 раз превышает скорость активного.

Первая система обладает кинетикой насыщения, вторая линейной кинетикой. Захват-1 осуществляется в основном только холинергическими нервными окончаниями, и захваченный холин преобразуется в ацетилхолин, в то время как захват-2 протекает в различных нейронах, глиоцитах и других клетках (почки, эритроциты, тромбоциты), где захваченный холин включается преимущественно в синтез лецитина и частично бетаина. По данным Haga (1971), 50% меченого холина активно, т. е. против градиента концентрации, перенесенного в синапсомы, преобразуется в ацетилхолин. При повышении  $[K^+]_o$  от 5 до 35 мМ 25% вновь синтезированного медиатора секретруется синапсомами в среду, при этом секреция повышается в присутствии убаина. Высвобождение холина из синапсом усиливается также при калиевой деполяризации, но в меньшей степени, чем секреция ацетилхолина. Свойства системы захват-1 для холина на всех изученных объектах (синапсомы мозга позвоночных, ресничный или верхний шейный ганглий, ганглии пиявок и т. д.) практически одинаковы. Холин активно транспортируется лишь нервами и их терминалями, но не телами холинергических нейронов ганглиев аплизии (Eisenstadt et al., 1975). Доказательством активного транспорта холина в синапсомы являются многочисленные факты торможения этого процесса (в отличие от захвата-2) ДНФ, KCN, монойодацетатом, тиоловыми реагентами, удалением глюкозы из раствора Кребса—Рингера, снижением температуры. Снижение  $[Na^+]_o$  приводит к резкому торможению захвата-1, т. е. активный перенос холина является Na-зависимым. По-видимому, этот процесс связан с Na,K-АТФ-азой, так как убаин практически полностью блокирует захват-1, но не захват-2. Снижение  $[Ca^{++}]_o$  не влияет на активный транспорт холина (Simon, Kuhar, 1976). Установлено, что поверхностные гликолипиды синапсом не участвуют в захвате холина, а также биогенных аминов и ГАМК (Wang et al., 1975). Однако частичная солюбилизация липидов из синапсом 0,01% раствором тритона X-100 нарушает активный транспорт холина. Холин, пассивно транспортируемый в синапсомы, при действии на них гипоосмотическим шоком или детергентами, высвобождается в инкубационную среду. Регуляторами захвата-1 являются ацетилхолин и холин. Так, по данным Yamashita, Snyder (1973), ацетилхолин конкурентно блокирует захват-1 холина синапсомами. Сам ацетилхолин не переносится в синапсомы; перенос его возможен лишь в результате пассивной диффузии.

Важным является установление регуляции транспорта холина в терминали при возбуждении. Согласно данным Biggs, McIntosh (1961), захват-1 холина активируется в ходе преси-



наптической стимуляции холинергических нервов. Это заключение основано на факте, что при стимуляции изолированных нервов и срезов мозга в присутствии меченого холина секретируется вновь синтезируемый ацетилхолин. Однако этот эффект можно объяснить также увеличением ресинтеза медиатора в ходе деполяризации. С другой стороны, захват-1 холина в ходе деполяризации минимален и увеличивается в ходе реполяризации мембран, т. е. после прекращения импульсации. На эту возможность указывают факты снижения или полного выключения активного транспорта холина в синапсосомы коры или морского конька мозга (Simon, Kuhar, 1976), в срезы коры мозга (Cargoll, Goldberg, 1975), при калиевой деполяризации. В этих условиях интенсивность захвата-2 увеличивается (Molenaar et al., 1973). Для выяснения специфичности транспортной системы холина изучено действие его структурных аналогов. Наиболее эффективным конкурентным блокатором системы захват-1 является гемихолин-3. Значение  $K_1$  для этого аналога холина в синапсосомах полосатого тела составляет  $2,5 \cdot 10^{-8}$  М, коры мозга —  $5 \cdot 10^{-6}$  М. Гемихолин-3 способен также тормозить Na, K-АТФ-азу мозга, хотя и в значительно меньшей концентрации, чем захват-1 холина. Этот реагент (в больших концентрациях) частично блокирует захват-2 холина. Предполагается, что гемихолин-3 действует непосредственно на молекулу переносчика холина. Способностью тормозить захват-1 холина обладают бензотропин, тригексифенидил, диэтазин и атропин. Первые три реагента являются лекарственными средствами против паркинсонизма и способны также угнетать синтез ацетилхолина. N-метил-N-оксиэтилпирролидон может замещать холин в системе захвата-1. Обнаружено, что нафтилвинилпиридин способен тормозить активный перенос холина, не влияя на синтез ацетилхолина.

## ХОЛИНОРЕЦЕПТОРЫ

Эти рецепторы наиболее изучены. Различают два типа холинорецепторов — никотиновые и мускариновые (С. В. Аничков, 1974), которые отличаются по своей структуре. Оба типа холинорецепторов могут участвовать в возбуждении и в торможении различных холинореактивных структур (табл. 12). Кроме того, каждый тип холинорецепторов имеет структурные различия в той или иной эффекторной клетке. Из холиномиметических средств следует выделить карбамилхолин, который реагирует с обоими типами холинорецепторов и не гидролизуется ацетилхолинэстеразой. Некоторые N-холиномиметические средства могут захватываться терминалями и препятствовать ацетилхолину депонироваться в СП. В результате этого ацетилхолин может высвободиться (пассивно) в синаптическую щель неза-

## Свойства М- и Н-холинорецепторов

Свойства	М-холинорецептор	Н-холинорецептор
Миметические средства	Мускарин, ареколин, пилокарпин, окситрморин, ацетил- $\beta$ -метилхолин	Никотин, субехолин, сукцинилхолин, тетраметиламмоний
Анионный центр	Карбоксильная или фосфатная группа. Малая гидрофобная зона вблизи центра	Карбоксильная или SH-группа. Большая гидрофобная зона вблизи центра
Литические средства	Атропин, скополамин, амизил	D-тубокурарин, гексаметоний, дигидро- $\beta$ -эритроиндин, тетраэтиламмоний
Наличие S—S-связей	Отсутствуют	Расположены на расстоянии 1,2 нм от анионного центра. Восстановление S—S-групп снижает чувствительность к ацетилхолину
Особенности эстерофильного центра	Возможность реакции эфирной связи ацетилхолина с $+\sigma$ -зарядом эстерофильного центра	Возможность реакции эфирного кислорода ацетилхолина с $-\sigma$ -зарядом эстерофильного центра. Возможное наличие в эстерофильном центре гистидина
Стереоконфигурация ацетилхолина	Реагирует в трансподобной форме (по соотношению к $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ группе). Трехточечная фиксация молекулы ацетилхолина с рецептором	Реагирует в цисподобной форме. Двухточечная фиксация медиатора с рецептором
Возможность регуляции ферментов	Взаимодействие медиатора с рецептором активирует регуляторную субъединицу гуанилатциклазы (Lee et al., 1972)	Холинорецептор может быть идентичен регуляторной субъединице фосфомоноэстеразы ТФИ (Torda, 1974)
Локализация	Сердце (Т), гладкие мышцы, железы, постганглионарные парасимпатические нервы, мозг: зрительный бугор, морской конек (В), кора, продолговатый мозг (Т)	Вегетативные ганглии, скелетные мышцы (В), надпочечники, электрический орган ската, поверхностные слои коры (В)

Примечания. 1. Таблица составлена по материалам М. Я. Михельсона, Э. В. Зеймаль (1970), С. А. Аничкова (1974), Karlin (1973), Potter (1974). 2. В — возбуждение, Т — торможение.

висимо от нервного импульса (Chion, 1973). Необходимо отметить, что некоторые структурные аналоги холина (триэтиламмоний, гемихолин-3), проникая в терминали, могут ацетилироваться вместо холина и депонироваться в СП как ложные медиаторы. При деполяризации эти ложные медиаторы секретир-

руются в синаптическую щель и действуют на рецептор как холинотические средства. В мозге позвоночных большинство холинотических нейронов способствует возбуждению (в основном М-холинорецепторов), в то время как торможение чаще всего осуществляется смешанными М,Н-холинорецепторами. Пирамидальные клетки коры мозга иннервируют возбуждающие холинореактивные корзинчатые клетки морского конька, которые в свою очередь через вставочные нейроны осуществляют торможение в коре.

Холинорецептор является белком, в активном центре которого содержатся SH-группы (Т. М. Турпаев, 1962). Для выделения холинорецептора из электрического органа ската (или угря), из скелетных мышц, из мозга (de Robertis, 1976), как правило, используют меченые агонисты или антагонисты, в частности для выделения Н-холинорецептора применяют такие полипептиды, как  $\alpha$ -бунгаротоксин и  $\alpha$ -нейротоксин для яда кобры. Эти полипептиды высокоспецифично, необратимо и аллостерически ингибируют активные центры холинорецептора, связываясь одновременно с двумя субъединицами рецептора. Согласно существующим представлениям, активными группами молекулы ацетилхолина, участвующими во взаимодействии с холинорецептором, являются катионная, аммонийная положительно заряженная «головка» и сложноэфирная связь, включая карбонильную группу. Соответственно топографии молекулы ацетилхолина белковая молекула холинорецептора имеет два активных центра (рис. 20): 1) отрицательно заряженный анионный центр, в который входят карбоксильные группы глутамата или аспартата, реагирующий с катионной «головкой» ацетилхолина; 2) эстерофильный центр, взаимодействующий с карбонильной группой и с кислородом эфирной связи молекулы медиатора. Холин, лишенный эфирной связи, практически не взаимодействует с рецептором. Для активности ацетилхолина и холиномиметических средств при взаимодействии с холинорецептором важно расстояние между катионной «головкой» и кислородом эфирной связи, равное 0,35 нм (см. рис. 20). Кислород эфирной связи молекулы ацетилхолина реагирует с рецептором либо посредством водородной связи, либо посредством диполь-дипольного взаимодействия положительного  $\sigma$ -заряда эфирного кислорода с нуклеофильным отрицательным  $\sigma$ -зарядом эстерофильного центра холинорецептора. Карбонильный кислород, имеющий отрицательный  $\sigma$ -заряд, реагирует с положительным  $\tau$ -зарядом эстерофильного центра холинорецептора (Triggle, 1965). Анионный центр построен одинаково или очень сходно во всех типах холинорецепторов, однако строение эстерофильного центра (его структура и пространственная локализация по отношению к анионному) различно в разных холинорецепторах.

Для выявления структуры Н-холинорецепторов скелетных мышц полезным оказалось изучение литического действия бис-

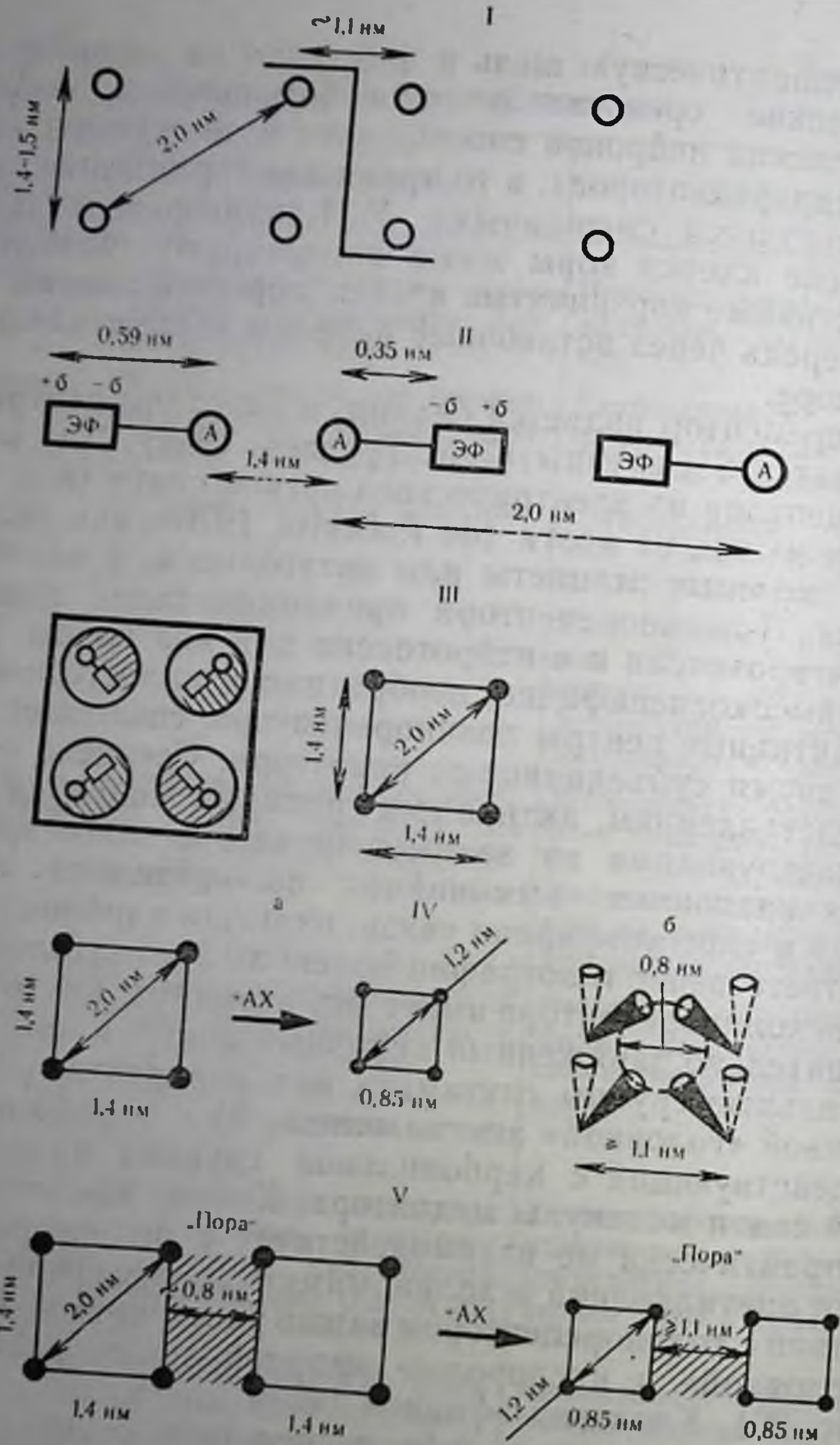


Рис. 20. Структура N-холинорецепторов. I — по Varlow (1960); II — по Р. С. Рыболовлеву, (1963); А — анионный центр. ЭФ — эстерофильный центр; III — по Н. В. Хромову-Борисову, М. Я. Михельсону (1965, 1966); заштрихованные области указывают на асимметричность структуры различных субъединиц холинорецептора; IV: а — по Н. В. Хромову-Борисову (1975), б — по Р. Л. Авояну (1975); АХ — ацетилхолин. Диаметр пор для гидратированного  $\text{Na}^+$   $\sim 1,1$  нм. В норме «пора» размером  $\sim 0,8$  нм окружена 4 субъединицами холинорецептора. При взаимодействии с АХ размер поры  $\geq 1,1$  нм; V — объединенная схема.

аммонийных соединений типа  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+ - (\text{CH}_2)_n - \text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ , особенно соединений  $n=6$  (структура рецептора типа С-6,  $n=9,10$  (тип С-10) и  $n=16$  (тип С-16)). По Н. В. Хромову-Борисову (1975), анионные центры отдельных мышечных N-холинорецепторов расположены по углам квадратов со сторонами,

равными 1,4 нм, и диагональю, составляющей 2 нм. Отсюда следует, что бис-аммонийные соединения, имеющие  $n=10$ , у которых расстояние между двумя атомами азота 1,4—1,5 нм, связывают анионные центры двух рецепторов одной и той же стороны квадрата, а бис-аммонийные соединения, имеющие  $n=16$ , у которых расстояние между двумя атомами азота составляет 2—2,2 нм, связывают анионные центры двух рецепторов, расположенных по диагонали, т. е. на противоположных углах квадрата. В ходе филогенеза первоначальное расположение мышечных холинорецепторов было линейным (тип С=16), а впоследствии оно становится тетрамерным (тип С-16 или С-10). В вегетативных ганглиях Н-холинорецептор обладает структурой типа С-6. Расстояние между двумя атомами азота у бис-аммонийных соединений, имеющих  $n=6$ , равно 1,1 нм.

Ранее считали, что функцию холинорецептора выполняет ацетилхолинстераза. Эта гипотеза оказалась ошибочной. Молекула холинорецептора является гидрофобным белком, пронизывающим всю толщу пост-СМ, в то время как молекула ацетилхолинэстеразы — гидрофобным белком, находящимся на поверхности этой мембраны. В молекуле холинорецептора главным является анионный центр, который, по-видимому, сходен с таковым для ацетилхолинэстеразы, в то время как в ферменте ведущая роль в гидролизе ацетилхолина принадлежит эстерофильному активному центру. Zupančič (1975) считает, что взаимодействие медиатора с холинорецептором активирует  $\beta$ -субъединицу ацетилхолинэстеразы (сходную с одной из субъединиц молекулы рецептора), которая далее аллостерически активирует каталитическую субъединицу фермента. В связи с этим отметим еще одну популярную точку зрения, согласно которой взаимодействие ацетилхолина с холинорецептором запускает цепную реакцию в эффекторной мембране благодаря присоединению одной из субъединиц рецептора к определенным олигомерным ферментам, которые после этого изменяют свою активность. Так, предполагается, что одна из субъединиц Н-холинорецептора сходна с каталитической субъединицей Na,K-АТФ-азы (Nischo, Changeux, 1973). Молекула холинорецептора в отличие от молекулы ацетилхолинэстеразы неспособна ацетилироваться фосфорорганическими соединениями.

Если в молекуле ацетилхолина заменить одну  $\text{СН}_3$ -группу при атоме азота на атом водорода, то холиномиметическая активность резко снижается. Эта замена не влияет на гидролизующее действие ацетилхолинэстеразы, что указывает на различную природу гидрофобных участков анионного центра рецептора и фермента.

Для холинорецептора (как и для рецепторов других медиаторных систем) описан интересный феномен десенситизации — уменьшение его чувствительности к большим концентрациям

ацетилхолина (например, в результате длительной синаптической активности). Этот феномен можно объяснить возникновением неактивных рецепторов в результате «субстратного торможения» активных рецепторов.

Для нервно-мышечных синапсов получены доказательства наличия Н-холинорецепторов на внешней стороне пост-СМ, т. е. в районе иннервации. Зона их расположения составляет 20—50 мкм, плотность рецепторов в районе пост-СМ —  $2-9 \cdot 10^7$  молекул, причем расстояние между молекулами рецепторов равно от 0,7 до 4 нм. Значение  $\tau_{50}$  для Н-холинорецептора, выделенного из синаптических мембран мозга, составляет 10—15 сут; изоэлектрическая точка находится в области рН 4,5—4,8 (de Robertis, 1975). Относительная молекулярная масса субъединицы М-холинорецептора мозга равна  $87 \cdot 10^3$ , число субъединиц в этом случае 4—6 (Birdsall, Halme, 1976). Время существования комплекса очищенного М-холинорецептора с агонистом составляет 0,4 мс, что в 3—4 раза меньше, чем активная фаза постсинаптического потенциала. Установлено (Potter, 1974; Changeux, 1975), что отн. мол. м. субъединиц Н-холинорецепторов различного происхождения равна  $40-45 \cdot 10^3$ , однако число субъединиц в олигомере колеблется от 4 до 8 и соответственно диаметр белковой глобулы — от 2 до 7 нм (Gage, 1976). Считают, что образование олигомеров происходит за счет окисления SH-групп белков.

Конечный физиологический ответ при взаимодействии медиатора и рецептора пост-СМ определяется характером конформационных изменений их молекул, приводящих к открытию каналов-ионофоров. В модельных опытах показано (de Robertis, 1976), что очищенный М-холинорецептор коры мозга животных аллостерически связывается с атропином, при этом резко увеличиваются светорассеяние и поляризация флюоресценции. Эффект неконкурентно блокируется ацетилхолином и конкурентно D-тубокурарином и объясняется ассоциацией макромолекул белка, что было доказано электронно-микроскопическими исследованиями. При взаимодействии гексаметония с очищенным Н-холинорецептором электрического органа ската или скелетных мышц наблюдается образование паракристаллических упорядоченных структур. Приведенные данные указывают на возможность структурных переходов в пост-СМ при взаимодействии медиатора с холинорецептором. Эти перестройки должны определять тот или иной путь изменения ионной проводимости благодаря активации определенных ионофоров. Возможны два варианта изменения функционирования ионофоров: 1) ионофоры не входят в структуру рецептора и активируются последующей цепью процессов в пост-СМ в результате реакции медиатора с рецептором, 2) ионофоры и рецептор относятся к одной и той же макромолекуле, где ионофор активируется (открывается) вследствие взаимодействия медиатора с рецептором. По

мнению de Robertis, для ацетилхолина наиболее вероятно вторая возможность.

С холинорецептором нервно-мышечных синапсов взаимодействуют две молекулы ацетилхолина. Присоединение одной молекулы к одной из субъединиц олигомера холинорецептора облегчает присоединение следующей молекулы, что указывает на кооперативность процесса.

Когда на пост СМ нервно-мышечного синапса наносят минимальную дозу ацетилхолина, наблюдаются небольшие случайные флюктуации потенциала, варьирующие в пределах 0,22 мкВ, в то время как при миниатюрном потенциале концевой пластинки эта величина составляет 700 мкВ (Katz, Miledi, 1972). Подобные элементарные флюктуации рассматриваются как проявление открытия и закрытия отдельных ионофоров под влиянием медиатора. Это явление продолжается при температуре 22°C около 1 мс.

Согласно расчетам, элементарный пульс тока в 10 пкА соответствует проводимости в  $10^{-10}$  мО с транспортом примерно  $5 \cdot 10^4$  одновалентных ионов. Таким образом, в физиологических условиях две молекулы ацетилхолина способны вызывать прохождение большого количества ионов через пост-СМ, что свидетельствует о высокой степени усиления сигнала в химическом синапсе.

Изучена реконструкция очищенного холинорецептора электрического органа угря на двухслойных мембранах, состоящих из холестерина и лецитина (de Robertis, 1976). Взаимодействие холинорецептора с этими липидами приводило к снижению сопротивления реконструированной мембраны; увеличению проводимости пропорционально 4-й степени концентрации белка в мембране, что указывало на тетрамерную модель рецептора; увеличению проводимости для  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , блокируемому тубокурарином: преходящему увеличению проводимости при инъекции ацетилхолина и миметических средств, блокируемому тубокурарином. В момент наивысшей проводимости активированные мембраны имели «сморщенный» вид, причем ультраструктурные изменения были преходящими и исчезали, когда мембрана приобретала исходную проводимость. Предполагается, что с белковой частью молекулы липопротеида связана рецепция и ионоформные свойства реконструированного холинорецептора.

По мнению de Robertis (1971, 1976), холинорецептор состоит из тетрамера, пронизывающего пост-СМ и связанного с фосфатидилинозитидом, где ионофор локализован и координирован внутри субъединиц белка, а открытие канала-ионофора происходит при изменениях четвертичной структуры рецептора. Конформационные изменения облегчаются тем, что холинорецептор окружен специфическими липидами, которые фиксируют его в определенной конфигурации при помощи гидрофобных взаимодействий (рис. 21). В некоторых работах отмечается, что

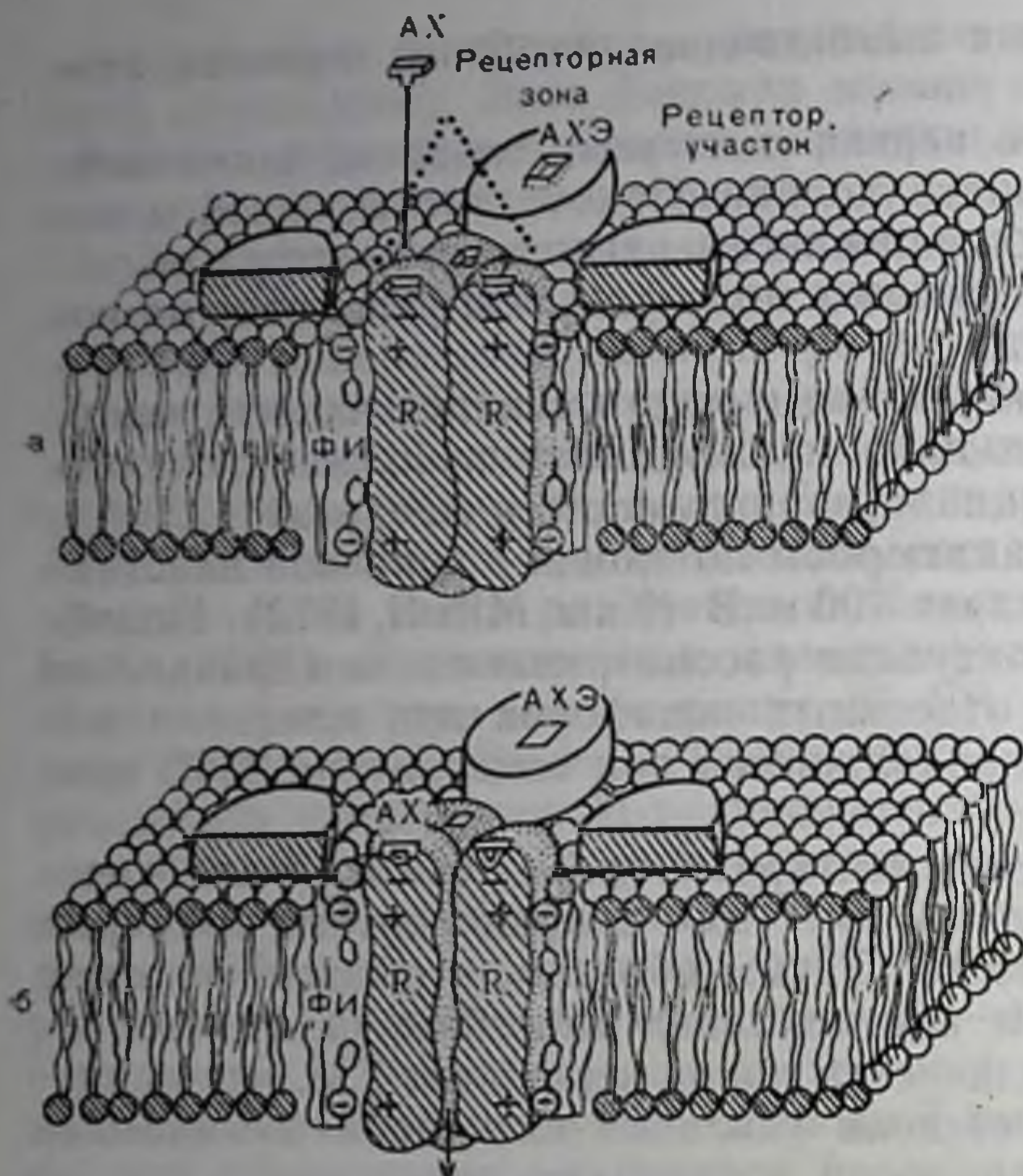


Рис. 21. Олигомерная модель холинорецептора (по де Робертису, 1976).

На каждой субъединице видно место связывания ацетилхолина с наружной поверхностью пост-См. Четыре параллельные субъединицы образуют ионфор. Показано наличие фосфатидилинозида (ФИ), связанного с рецепторным белком. Молекулы ацетилхолинэстеразы (АХЭ) находятся на периферии мембран; а — рецептор (R) в закрытом состоянии; б — рецептор, занятый АХ, в открытом состоянии.

Н-холинорецептор электрического органа ската (Changeux, 1975) или диафрагмы (Brookes, Hall, 1975) является кислым гликопротеидом. Кроме того, выделенный Н-холинорецептор содержал связанный Са. Наличие  $\text{Ca}^{++}$  важно для функционирования холинорецепторов. Считается, что взаимодействие медиатора с холинорецептором приводит к десорбции Са, а вследствие «дестабилизации» пост-СМ происходит увеличение катионной проницаемости. В связи с этим заслуживают внимания факты о том, что скорость десенситизации Н-холинорецепторов возрастает при увеличении  $[\text{Ca}^{++}]_o$  (Л. Г. Магазаник, 1968). Для изучения связывающих Са участков молекулы Н-холинорецептора недавно предложен высокоизбирательный флуоресцентный зонд —  $\text{Tb}^{+++}$  (Rübsamen et al., 1976).

## АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗА

Ацетилхолинэстераза открыта в 1936 г. и довольно хорошо изучена (М. Я. Михельсон, Э. В. Зеймаль, 1970; В. И. Розенгардт, 1974). Уровень активности этого фермента является важным показателем функции холинергических синапсов. Существуют ацетилхолинэстераза, холинэстераза и бензоилхолинэстераза, которые отличаются друг от друга локализацией в нервной ткани, структурой и функциями. Два последних фермента в отличие от



ацетилхолинэстеразы обладают низкой субстратной специфичностью и гидролизуют бутирилхолин, бензоилхолин, но не ацетил- $\beta$ -метилхолин; как правило, они не тормозятся избытком субстрата и избирательно инактивируются фосфорорганическими соединениями, содержащими изопропильные группы, в то время как ацетилхолинэстераза избирательно блокируется бисчетвертичными аммонийными соединениями. Холинэстераза мозга локализована в капиллярах и нейроглии, а также в сыворотке крови и мышцах. Функция холинэстеразы состоит в защите клеток от гормонального действия ацетилхолина и эфиров холина. Ацетилхолинэстераза является типичным ферментом нейронов, локализованным прежде всего в синаптических мембранах, где она инактивирует «отработанный» ацетилхолин. Гидролиз ацетилхолина принадлежит к числу наиболее быстрых процессов, хотя средняя скорость его в 4—10 раз ниже скорости реакций, катализируемых фосфокиназами. Скорость действия ацетилхолинэстеразы гораздо выше, чем холин-ацетилтрансферазы. В пост-СМ скелетных мышц за 1 мс ацетилхолинэстераза гидролизует  $1,6 \cdot 10^9$  молекул медиатора. В зоне пост-СМ находится до  $2,4 \cdot 10^7$  молекул фермента. Ацетилхолинэстераза локализована также в цитоплазматической сети нейронов, где она синтезируется и далее с аксотоком мигрирует в терминаль, а также в аксолемме, причем даже и нехолинергических нервов. Фермент имеется также в эритроцитах и мышцах.

Региональное распределение ацетилхолинэстеразы, как правило, не совпадает с таковым ацетилхолина и холин-ацетилтрансферазы. Активность ацетилхолинэстеразы в мозге позвоночных максимальна в хвостатом ядре, зрительном бугре, подбугорной области, мозолистом теле, новой коре и меньше — в коре головного мозга. После субклеточного фракционирования ткани головного и спинного мозга различных животных наибольшая активность определяется в микросомах и особенно в синаптических мембранах (de Robertis, 1965). Митохондрии и СП не содержат ацетилхолинэстеразы. Некоторые авторы (Politoff et al., 1975) полагают, что в ходе длительного возбуждения терминалей часть молекул фермента может встраиваться в мембраны СП, блокируя синаптическую передачу. Гистохимические исследования показали (Koelle, 1969), что ацетилхолинэстераза локализована преимущественно в синаптических структурах мозга, главным образом на внешней стороне пост-СМ. Фермент может располагаться также на внешней стороне пре-СМ (для регуляции функции пресинаптических холинорецепторов) и в меньшей степени на внутренней стороне пре-СМ для дополнительного контроля за уровнем свободного ацетилхолина (рис. 22). Присутствие ацетилхолинэстеразы на наружной стороне пост-СМ согласуется с тем, что сам медиатор, содержащий четвертичный азот, плохо проникает через пост-СМ. Чтобы ограничить действие ацетилхолина во времени и про-

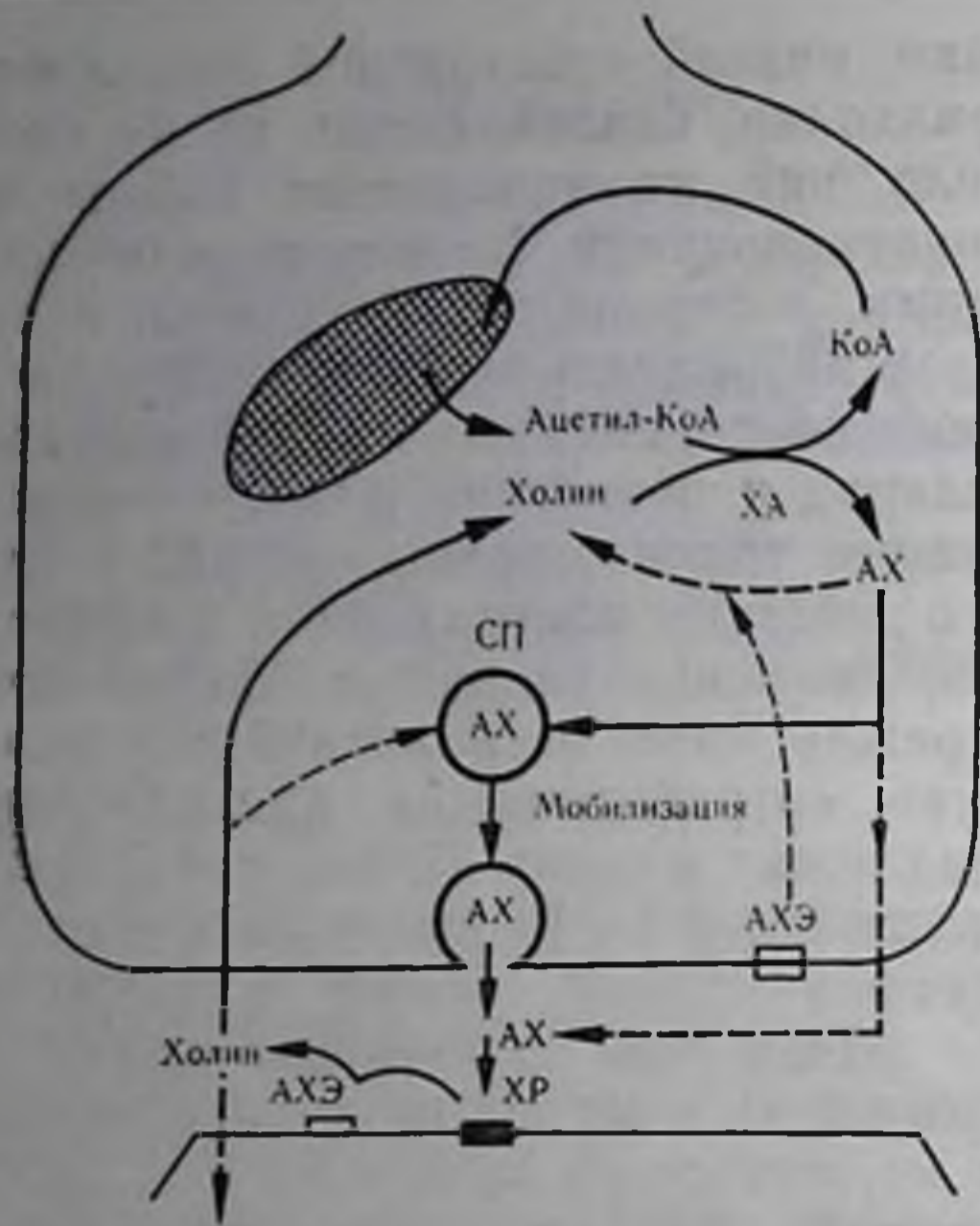


Рис. 22. Кругооборот ацетилхолина в холинэргическом синапсе.

АХ — ацетилхолин; АХЭ — ацетилхолинэстераза; ХА — холин-ацетилтрансфераза; ХР — холинорецептор. Прямые линии — доказанные реакции, прерывистые — вероятные реакции.

билизируется 0,1% раствором тритона X-100 или 0,5% раствором дезоксихолата. Доказано (Lenasi, Pavlic, 1975), что часть фермента связана с синаптическими мембранами электростатическими силами, а другая (большая) — гидрофобными. Свойства растворимого и мембраносвязанного фермента отличаются (кинетика реакции, действие ингибиторов, количество изоферментов, меньшее значение  $\tau_{50}$ ). В регуляции каталитических свойств ацетилхолинэстеразы участвуют липиды. Есть указания, что ацетилхолинэстераза эритроцитов, электрического органа ската (Wiedmer et al., 1974) и мозга животных (Wenthold et al., 1974) является гликопротеидом, который содержит ганглиозиды (Di Cesage, Dain, 1972). Различия в свойствах ацетилхолинэстеразы разных мембранных структур нервной ткани могут объясняться набором субъединиц, входящих в состав молекулы, липидным окружением и изоферментным составом (до 3—5 изоферментов). В настоящее время ацетилхолинэстераза из электрического ската (или угря) выделена в кристаллическом виде. Оптимум pH реакции равен 7,8—8,0; изоэлектрическая точка находится при pH 5,0—5,5;  $K_m$  — 0,1—0,2 мМ. По данным Leuzinger и соавт. (1969), Clothia, Leuzinger (1975), ацетилхолинэстераза состоит из двух субъ-

странстве, основная часть фермента распределена именно в пост-СМ эффекторных клеток на расстоянии не более 1 мкм от холинорецептора. Интересно, что в вегетативных ганглиях ацетилхолинэстераза находится в основном в пре-СМ. В этих структурах синаптическая передача более медленная, чем в холинэргических синапсах, в которых ацетилхолинэстераза находится только в пост-СМ (Т. М. Турпалев, Д. А. Сахаров, 1967). При использовании синаптосом или синаптических мембран мозга было показано (Р. Н. Глебов и др., 1971), что 20—30% ацетилхолинэстеразы солюбилизируется в среде с высокой ионной силой и около 90% солю-

единиц. Малая каталитическая субъединица ( $\alpha$ ) является сиа-  
логликопротеидом (отн. мол. м.  $58-64 \cdot 10^3$ ), состоящим из  
 $\alpha$ -полипептидных цепей. Большая регуляторная субъединица  
( $\beta$ ) — также сиалогликопротеид (отн. мол. м.  $80-90 \cdot 10^3$ ), состоит  
из  $\beta$ -полипептидных цепей. Глобулярная форма молекулы раство-  
римого фермента представлена тетрамером состава  $\alpha_2\beta_2$ . В сре-  
де с высокой ионной силой мономеры легко образуют олиго-  
меры. Электронно-микроскопические исследования выявили  
также наличие асимметричной формы фермента, состоящей из  
гидрофобного хвоста, фиксирующего молекулу в мембране, и  
и гроздьевидных активных субъединиц переменного состава:  
 $\alpha_2\beta_2$ ,  $\alpha_4\beta_4$  и  $\alpha_6\beta_6$ . Этим объясняется многообразие форм фермен-  
та в различных структурах мозга и мышцах. По-видимому,  
гроздьевидная форма ацетилхолинэстеразы характерна для мем-  
бранно-связанного фермента.

Ацетилхолинэстераза является аллостерическим ферментом.  
Показано, что  $Ca^{++}$  и ацетилхолин конкурируют за аллостери-  
ческий центр фермента электрического органа ската (Gridalet  
et al., 1970). Согласно нашим данным (Р. Н. Глебов и др., 1974),  
низкие концентрации  $Ca^{++}$  активируют фермент мозга. Чувстви-  
тельностью к  $Ca^{++}$  обладает лишь высокомолекулярная форма  
ацетилхолинэстеразы. Changeaux (1966) допускает наличие  
двух равновесных конформационных состояний фермента, кото-  
рые отличаются по сродству к ацетилхолину: состояние в поля-  
ризованной и деполаризованной мембране. Таким образом, фак-  
тор аллостерии становится определяющим для активации  
ацетилхолинэстеразы пост-СМ при возбуждении. Эти факты со-  
гласуются с представлениями о том, что при взаимодействии ме-  
диатора с холинорецептором высвобождаются  $Ca^{++}$  из пост-СМ  
и тем самым «запускается» последующий гидролиз ацетилхоли-  
на (Lievremont et al., 1969). Ионы кальция восстанавливают ак-  
тивность ацетилхолинэстеразы после ее аллостерического тор-  
можения D-тубокурарином. В молекуле ацетилхолинэстеразы  
электрического органа ската есть каталитическая субъединица  
АДЦ-азы, которая активируется только после добавления аце-  
тилхолина к очищенному препарату фермента.

При секреции ацетилхолина в синаптическую щель большие  
концентрации субстрата «выключают» фермент (субстратное  
торможение). «Включение» ацетилхолинэстеразы определяется  
концентрацией ацетилхолина и ионов (особенно  $Ca^{++}$ ) в синап-  
тической щели. Тонкая регуляция активности ацетилхолинэсте-  
разы обеспечивает ее «включение» только после реакции медиа-  
тора с холинорецептором.

В молекуле ацетилхолинэстеразы два активных центра (рас-  
стояние между ними  $0,4-0,5$  нм): 1) анионный центр, в кото-  
ром карбоксил аспартата (или глутамата) создает отрицатель-  
ный заряд, взаимодействующий с катионной «головкой» ацетил-  
холина; 2) эстерофильный центр, в котором гидроксил серина

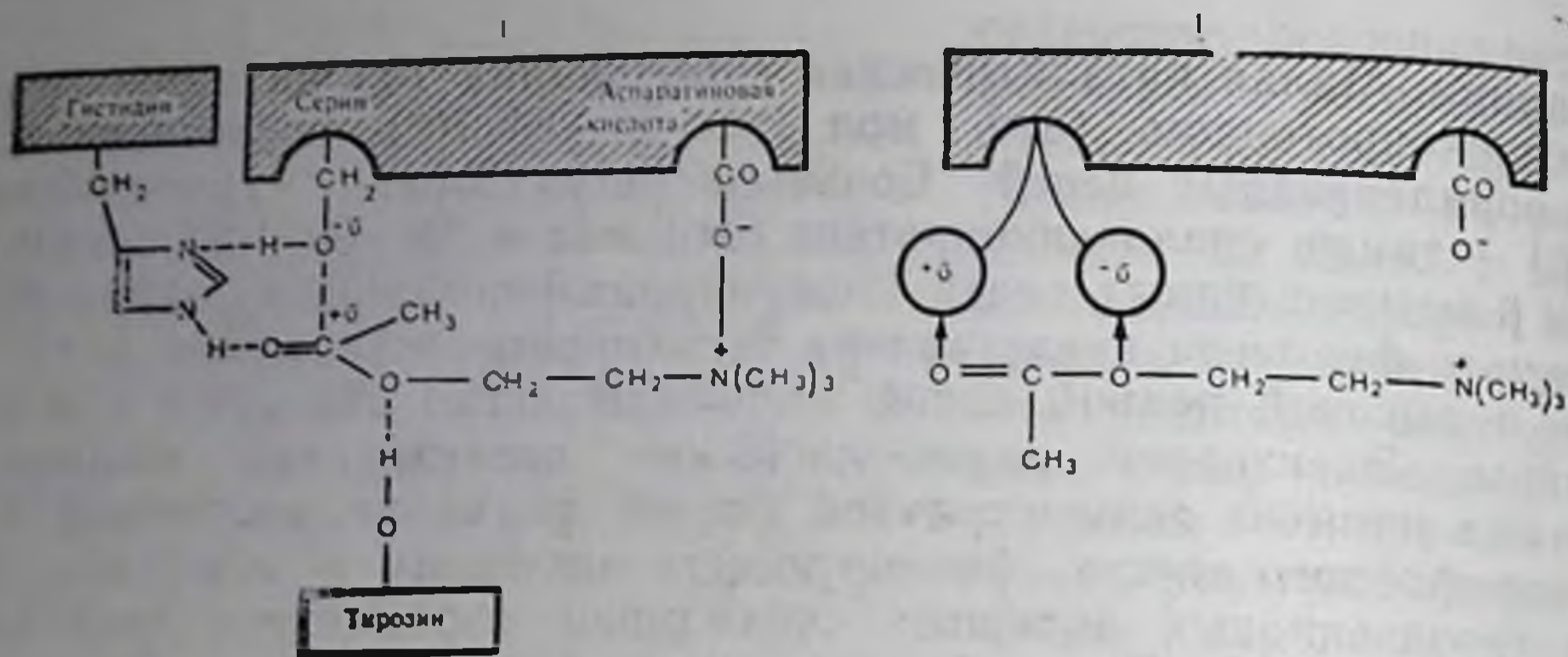


Рис. 23. Активные центры ацетилхолинэстеразы (I) и холинорецептора (II).

реагирует с положительно заряженным ( $+σ$ ) углеродом карбонильной группы молекулы медиатора. В состав эстерофильного центра (рис. 23) молекулы фермента входят также имидазольный остаток гистидина (акцептор протона) и тирозин (донор протона). Реакция происходит следующим образом: ацетилхолин  $+H_2O \rightarrow$  холин + уксусная кислота. Катионная «головка» молекулы ацетилхолина электростатически связывается с анионным центром фермента. После фиксации молекула ориентируется на поверхность фермента благодаря водородным связям, образуемым карбонильной группой и кислородом эфирной связи ацетилхолина. Нуклеофильная группа фермента (гидроксил серина) соединяется затем с электрофильным углеродным атомом карбонильной группы ацетилхолина. Затем эта нуклеофильная группа отдает свой протон, при этом происходит разрыв сложноэфирной связи молекулы медиатора. Образовавшийся холин отрывается от анионного центра фермента. Ацетилированное производное фермента быстро гидролизуется водой с освобождением уксусной кислоты, при этом протон возвращается нуклеофильной группе фермента.

Ингибиторы ацетилхолинэстеразы (антихолинэстеразные препараты) удлиняют постсинаптическое действие ацетилхолина. Обратимыми конкурентными ингибиторами, действующими на оба активных центра фермента, являются эзерин и прозерин. Обратимо и конкурентно ингибируют фермент тетраалкиламмонийные соли, действующие на анионный центр ацетилхолинэстеразы. Эти ингибиторы тормозят гидролиз и таких субстратов, которые не содержат катионных «головок» и не могут взаимодействовать с анионным центром фермента (например, метилхлорацетат). Эти данные позволили предположить, что присоединение ингибиторов к анионному центру молекулы фермента сопровождается конформационными изменениями эстерофильного центра. Другой тип ингибиторов связан с их необратимым

действием на эстерофильный центр фермента. Примером таких ингибиторов являются диизопропилфторфосфат и другие фосфорорганические соединения (табун, зарин, зоман), а также карбаматы, способные необратимо фосфорилировать фермент. Реактиваторами ацетилхолинэстеразы в последнем случае являются производные гидроксилamina, гидроксамовой кислоты и N-оксимы, имеющие в своем составе группу  $-CH=N-OH$ .

Ингибиторами ацетилхолинэстеразы служат также различные вещества: некоторые наркотики, анальгетики, кофеин и стрихнин. Большинство ингибиторов ацетилхолинэстеразы обладает холиномиметическим действием на холинорецепторы, предотвращаемым холинолитическими средствами.

## 11. Биохимия адренергических синапсов

---

### РЕГИОНАЛЬНОЕ И СУБКЛЕТОЧНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ КАТЕХОЛАМИНОВ

Медиаторная и синаптическая функция катехоламинов была открыта в 1922 г. Löwi, который обнаружил, что симпатические нервы сердца лягушек секретируют адреналин. В 1948 г. Euler показал, что в симпатических нервах млекопитающих медиатором является норадреналин. Локализацию нейронов, содержащих катехоламины (норадреналин и дофамин), можно установить гистохимическим методом Фалька и Хиллара (1962). Метод основан на получении люминесцирующих производных соответствующих моноаминов в результате их реакций с формальдегидом (табл. 13; рис. 24). Наибольшее количество норадреналинсодержащих нейронов находится в среднем, продолговатом и промежуточном мозге, в мосту, в гипоталамо-гипофизарной системе. Норадреналинреактивные структуры широко представлены в подбугорной области, зрительном бугре, лимбических отделах мозга. Дофаминергические нейроны в ЦНС располагаются в основном в среднем мозге (хвостатое ядро, черная субстанция), а также в сетчатке и подбугорной области. Обнаруживается дофамин и в симпатических ганглиях. Оба катехоламина проявляют медиаторные функции и в нервной системе беспозвоночных. Дофамин в отличие от

Региональное распределение биогенных аминов (в микрограммах на 1 г ткани) в ЦНС собаки, кошки, человека и крысы (Erspamer, 1961; Fuxe, 1965)

Область мозга	Норадреналин	Дофамин	Серотонин	Гистамин
Кора головного мозга	0,03—0,22	0,00—0,10	0,04—0,24	0,07—0,40
Серое вещество коры	—	—	0,27—0,68	—
Хвостатое ядро	0,04—0,22	3,1—8,0	0,27—1,60	0,14—0,50
Полосатое тело	0,02—0,20	1,6—5,3	0,08—0,23	—
Обонятельные доли	0,05	—	0,11—0,35	—
Ствол	—	—	0,75—0,79	—
Морской конек	0,14	0,13	0,64	—
Миндалевидное тело	0,1—0,2	0,5	0,2—0,3	—
Перегородки	0,3	0,04	0,03—1,5	—
Средний мозг	—	—	0,97—1,70	—
Подбугорная область	0,76—2,05	0,26—0,75	1,70—2,0	1,25—10,0
Промежуточный мозг	0,17—0,34	0,09—0,16	—	—
Зрительный бугор	0,02—0,09	0,01—0,07	0,22—0,24	0,26—0,50
Передние и задние ножки мозга	0,11—0,16	0,10—0,13	0,1—0,2	—
Черная субстанция	0,04	0,40	1—4	—
Красное ядро	0,22	0,19	—	—
Сетчатое образование	0,35	—	1,5—2,0	—
Варолиев мост	0,04—0,41	0—0,11	0,38—0,70	—
Мозжечок	0,06—0,13	0,03—0,02	0,07—0,30	0,05—0,50
Продолговатый мозг	0,37—0,39	0,13	0,63—1,20	0,5—0,8
Area Postrema	1,04	—	0,26	—
Блудный шар	0,2—0,3	—	0,1—0,2	—
Белое вещество головного мозга	0	0,42	0—0,13	—
Передний рог морского конька	0,18	—	0,1—3	—
Задний рог морского конька	0,1—2,0	—	0,05—0,1	—
Гипофиз	—	—	—	1,8—10

норадреналина отсутствует в спинном мозге. Гистохимическими методами установлено, что норадреналин и дофамин локализованы главным образом в нервных окончаниях, в телах нейронов содержание медиаторов незначительное (А. Ю. Буданцев, 1976).

Гистохимический анализ показал, что местом хранения катехоламинов в нейронах ЦНС и периферической нервной системы являются гранулярные СП нервных окончаний (Geffen, Livett, 1971). Моноаминергическая терминаль представляет собой конечную часть аксона с характерными варикозными расширениями (толщина 0,8—1,2 мкм, длина 0,5—3 мкм, на 100 мкм

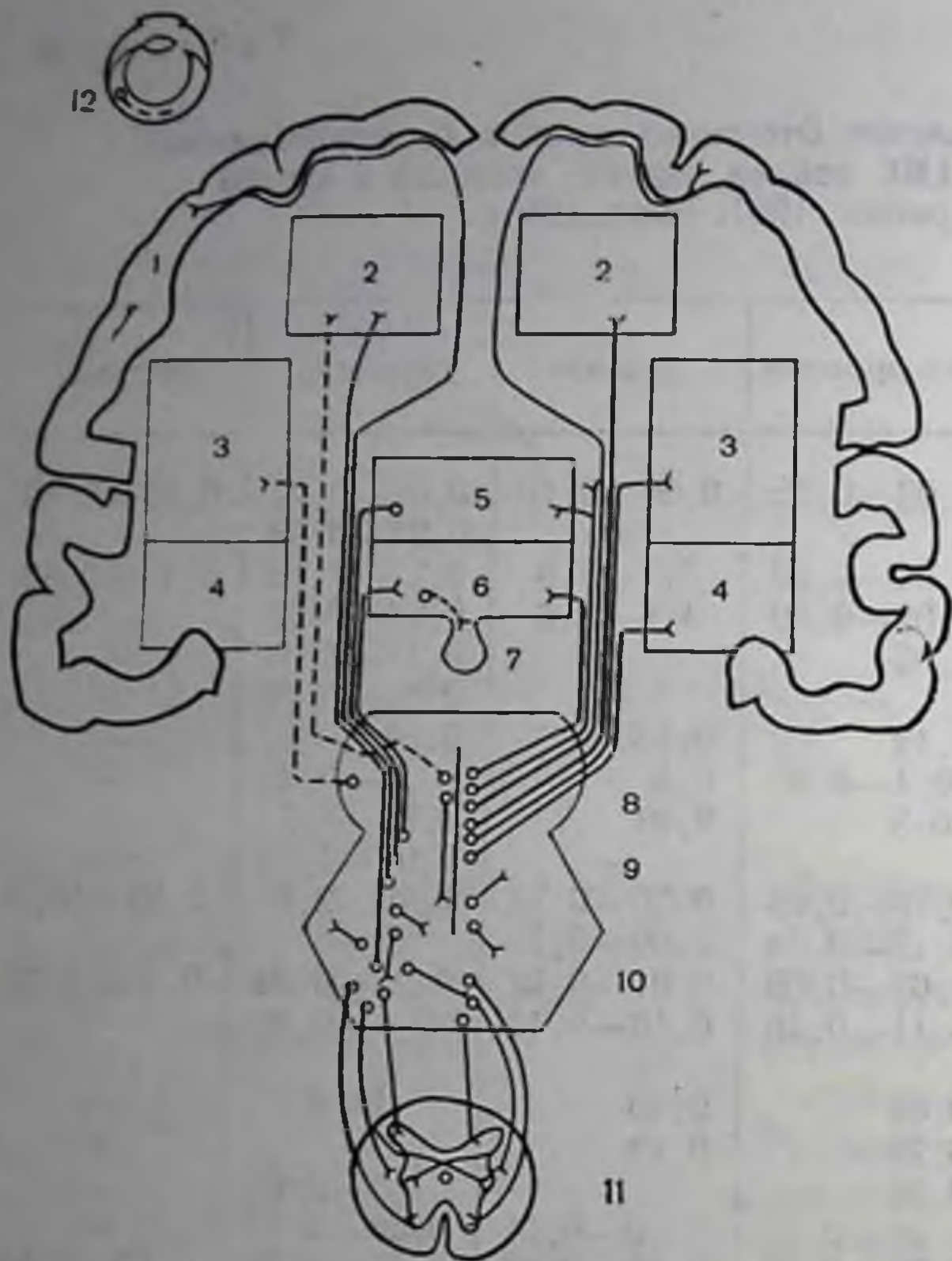


Рис. 24. Моноаминергические системы нейронов в центральной нервной системе млекопитающих (по Fuxe, 1967, с изменениями).

Сплошные линии — серотонин (справа), норадреналин (слева), пунктирные — дофамин (слева). 1 — новая кора; 2 — лимбические отделы переднего мозга, 3 — новые и 4 — старые зоны полосатого тела; 5 — зрительный бугор; 6 — подбугорная область; 7 — медиальный пучок переднего мозга; 8 — средний мозг; 9 — мост мозга; 10 — продолговатый мозг; 11 — спинной мозг; 12 — сетчатка.

длина волокна содержит 15—30 расширений). Биохимические исследования показали также, что норадреналин и дофамин в основном (до 70—80%) определяются в синапсоммах различных структур мозга (de Robertis, 1965; Smith, 1972); при дальнейшем разделении максимальное содержание катехоламинов (до 50—70%) установлено в СП<sup>1</sup>, которые являются местом хранения норадреналина и дофамина в соответствующих терминалях. Исследования по субклеточной локализации ферментов синтеза катехоламинов, а также опыты с мечеными предшественниками свидетельствуют о том, что норадреналин синтезируется непосредственно в СП. Кроме норадреналина и дофамина, функции медиаторов могут выполнять и другие катехоламины: адреналин — в ткани сердца лягушек, в некоторых нейронах мозга позвоночных и, по-видимому, октопамин — в спинном мозге обезьян (Molinoff, Axelrod, 1972) и нервной системе ракообразных (Evans et al., 1975).

<sup>1</sup> Несколько меньшие значения, получаемые методом выделения субклеточных фракций, объясняются тем, что в ходе выделения часть медиатора удаляется из СП.



## ДЕПОНИРОВАНИЕ НОРАДРЕНАЛИНА И ДОФАМИНА В СИНАПТИЧЕСКИХ ПУЗЫРЬКАХ

Различают три фонда норадреналина в терминалях (Smith, 1972; Bisby et al., 1973): 1) свободный (5—10%), состоящий из обратного захваченного из синаптической щели и частично вновь синтезированного в цитоплазме терминалей; 2) прочно связанный резервный, локализованный в крупных гранулярных СП диаметром 80—120 нм; 3) лабильно связанный, локализованный в малых гранулярных СП диаметром 40—50 нм. По гистохимическим данным в терминалях 90—95% норадреналина находится в СП в связанной форме. Концентрация свободного норадреналина в варикозных расширениях составляет около 0,1 мМ (Euler, 1967). Концентрация свободного ацетилхолина в синапсосомах составляет такую же величину (Schubert et al., 1971).

Согласно расчетам, в одном СП содержится  $15 \cdot 10^3$  молекул норадреналина (Geffen, Livett, 1971). В изолированных СП селезеночного нерва находится 75% норадреналина по сравнению с гомогенатом нерва. Концентрация катехоламинов в хромоаффинных гранулах или в адренергических СП очень высока (0,5—0,8 М). Количество больших СП составляет 4—5% от общего их количества в терминали. Значительные количества больших СП находятся в аксоплазме. Активность дофамин- $\beta$ -гидроксилазы выше в крупных СП, чем в малых. Это указывает, что синтез медиатора происходит преимущественно в крупных гранулярных СП. Предполагается, что малые СП образуются из крупных, однако механизм такой деструкции неясен. Малые гранулярные СП содержат норадреналин, готовый к секреции. Крупные СП нечувствительны к резерпину, гуанетидину,  $\alpha$ -метилтирозину, которые способны вытеснять норадреналин и дофамин из малых СП. Метараминол способен истощать запасы норадреналина в обоих типах СП. Малые СП, как и большие, могут образовываться в теле нейрона и поступать с аксоном в терминаль. Ложные медиаторы и норадреналин, захваченный терминалью, депонируются в основном в малых СП. Крупные СП лишь синтезируют, но не накапливают катехоламины. Синтез норадреналина происходит на внутренней стороне пузырьков, при этом вновь синтезируемый медиатор составляет менее 10% от общего его содержания в неразрушенных СП. Значение  $t_{50}$  адренергических СП составляет 35—70 сут для седалищного нерва крысы, кролика и кошек. Если учесть, что обмен норадреналина в терминалях происходит довольно быстро, то СП могут быть многократно использованы в синаптической передаче. Содержание норадреналина в симпатических нервах даже при интенсивной их стимуляции остается постоянным, т. е. убыль секреции может восполняться его ресинтезом в ходе стимуляции. С другой стороны, в децентрализованных, т. е. пере-

резанных, нервах стимуляция вызывает некоторое уменьшение запасов норадреналина. Данный принцип получил свое объяснение после расшифровки механизмов регуляции обмена катехоламинов (Euler, 1959).

**Везикулярный захват.** Адренергические СП способны захватывать синтезированный в цитоплазме дофамин, который превращается в них в норадреналин. Однако наличие свободного фонда медиатора указывает на существование динамического равновесия между свободным и связанным фондом, причем это равновесие сдвинуто в сторону везикулярного норадреналина. Определенная часть свободного норадреналина (особенно захваченного терминалями из синаптической щели) может накапливаться в малых СП. Предполагается, что существует два типа везикулярного захвата моноаминов: 1) пассивный, по градиенту концентрации; 2) активный, зависимый от температуры захват L-норадреналина против градиента концентрации, требующий наличия в среде инкубации  $Mg^{++}$  и АТФ, тормозимый резерпином и ингибиторами Mg-АТФ-азы. Механизм захвата норадреналина и дофамина адренергическими СП может быть различным, поскольку резерпин, метараминол, тирамин,  $\alpha$ -метильные производные и другие реагенты способны конкурентно блокировать в большей степени везикулярный захват норадреналина и адреналина, чем дофамина. В этих условиях происходит истощение запасов медиатора в СП. После действия резерпина высвобожденный из СП норадреналин разрушается МАО и частично выходит (но не секретировается) в синаптическую щель. Таким образом, резерпин и подобные ему вещества оказывают не прямое адреномиметическое действие. Захваченный синаптосомами мозга  $^{14}C$ -норадреналин выходит из синапсом при добавлении в инкубационную среду резерпина или тирамина. При действии резерпина из СП не высвобождаются АТФ и белки, участвующие в хранении медиатора. Отмечено, что захват катехоламинов в изолированные СП конкурентно тормозится их избытком. Гипотетические молекулы-переносчики (своеобразные везикулярные рецепторы) в системе везикулярного захвата, по-видимому, отличаются от адренорецепторов пост-СМ.

В опытах *in vivo* и *in vitro* показано, что некоторые  $\alpha$ -метильные производные предшественников катехоламинов ( $\alpha$ -метилтирозин,  $\alpha$ -метил-ДОФА и др.) способны подвергаться декарбоксилированию и  $\beta$ -гидроксилированию, а продукты этих реакций (ложные медиаторы) накапливаются в СП, вытесняя естественный медиатор. Ложные медиаторы устойчивы к действию МАО и способны секретироваться при вызванной стимуляции нервов. Как правило, ложные медиаторы не влияют на адренорецепторы пост-СМ или блокируют их. Следует также учитывать, что  $\alpha$ -метильные производные являются ингибиторами ферментов синтеза катехоламинов. Некоторые из ложных медиаторов, напри-

мер 6-оксидофамин, накапливаясь в СП, способны вызывать дегенерацию, особенно дофаминергических нейронов.

В механизме везикулярного захвата важную роль играет АТФ-аза СП, стимулируемая  $Mg^{++}$  или  $Ca^{++}$ . Резерпин тормозит АТФ-Mg-зависимый захват норадреналина в изолированные СП подбугорной области свиньи и также ингибирует АТФ-азу этих пузырьков (Phillippi et al., 1969). Скорость высвобождения катехоламинов из СП или хромаффинных гранул в присутствии комплекса АТФ-Mg усиливается  $Ca^{++}$ , при торможении АТФ-азы, при добавлении цАМФ и суммарных цитоплазматических белков терминалей (Ока et al., 1975). Ионы кальция связывают около 50% анионных групп поверхности хромаффинных гранул, уменьшая поверхностное натяжение в мембране. В этих условиях может повышаться вероятность связывания гранул с внутренней поверхностью клеточной мембраны (Dean, Matthews, 1974).

По-видимому, в состоянии покоя АТФ-аза СП, регулируемая  $Mg^{++}$ , участвует в везикулярном захвате, а при возбуждении АТФ-аза, регулируемая  $Ca^{++}$ , участвует в секреции медиаторов при контакте СП с пре-СМ.

**Форма депонирования норадреналина в везикулах.** Биохимический состав различных адренергических СП сходен с составом наиболее исследованных хромаффинных гранул надпочечников (Winkler, 1976; Lagercrantz, 1976). Очищенные гранулы содержат (в процентах к сухой массе): катехоламинов 20,5 (ад-реналин и норадреналин), белков 35, нуклеотидов 15 (АТФ, ГТФ и АДФ), липидов 22 (холестерин и фосфолипиды с большим содержанием лизолецитина) и в качестве минорных компонентов — гликозаминогликаны, аскорбат и  $Ca^{++}$ . В составе хромаффинных гранул имеются следующие ферменты: Mg-АТФ-аза, дофамин- $\beta$ -гидроксилаза, цитохром b-561, НАД.Н-оксиредуктаза и фосфатидилинозитолкиназа. Молярное соотношение катехоламины/АТФ в гранулах составляет в среднем 4,5, а холестерин/фосфолипиды — 0,6. Большая часть белков гранул является растворимыми липопротеидами. Таким образом, состав мембран хромаффинных гранул в некотором отношении уникален (очень высокое соотношение липид/белок). Основным растворимым белком гранул (50%) является открытый в 1967 г. кислый белок хромогранин А (отн. мол. м. димера  $8 \cdot 10^4$ , две субъединицы соединены дисульфидной связью). Дофамин- $\beta$ -гидроксилаза в гранулах находится преимущественно в мембранах (отн. мол. м. тетрамера  $29 \cdot 10^4$ , является гликопротеидом). Одна из субъединиц растворимой дофамин  $\beta$ -гидроксилазы представляет собой хромогранин А. Около 25% мембранных белков гранул составляет хромомембрин А, также входящий в состав дофамин- $\beta$ -гидроксилазы. Другой мембранный белок — хромомембрин В (отн. мол. м.  $28 \cdot 10^3$ ) входит в структуру цитохрома b-561.

Количество растворимых белков (до 25%) и норадреналина в больших гранулярных СП адренергических нервов значительно ниже, чем в хромаффинных гранулах. Молярное соотношение норадреналин/АТФ в больших СП составляет (6,8—7,3): 1, а в малых гранулярных СП—(4—5): 1, что указывает на более прочное связывание медиатора в малых СП. Содержание комплекса норадреналин—АТФ—хромогранин в матриксе малых СП выше, чем в больших. Содержание хромогранина А в больших СП значительно меньше, чем в малых. В жидкой фазе больших СП содержится 8—18% дофамин- $\beta$ -гидроксилазы. При разделении белков хромаффинных гранул часть хромогранина связывается с фосфолипидами (хромогранин В). Очищенный хромогранин А в присутствии АТФ диссоциирует на субъединицы с отн. мол. м.  $4 \cdot 10^4$ . В хромогранине А имеется большое количество глутамата (26%) и пролина. В отличие от глобулярных белков хромогранин А имеет высокую внутреннюю вязкость и большой гидродинамический объем. При увеличении ионной силы раствора хромогранин А агрегирует. Лишь небольшая часть полипептидной цепи имеет  $\alpha$ -спираль. По иммунологическим данным хромогранин А надпочечников и СП адренергических нервов идентичен. Хромогранин А в высокой концентрации (в форме геля) способен благодаря наличию множества анионных групп в присутствии АТФ образовывать с норадреналином мицелярный комплекс. Таким образом, формой депонирования норадреналина в СП является комплекс хромогранина с АТФ. Обработка хромаффинных гранул РНК-азой приводит к высвобождению в среду АТФ и катехоламинов (Phillipru et al., 1963). По-видимому, процесс везикулярного захвата катехоламинов отличается от механизма их депонирования. Так, после удаления из гранул хромогранина и АТФ способность активного захвата катехоламинов сохраняется (Phillips, 1974). Автор показал также, что кривая Аррениуса, характеризующая процесс захвата катехоламинов «тенями» хромаффинных гранул, имеет излом при 29°C, а для активности Mg-АТФ-азы точка перегиба кривой иная. Хромаффинные гранулы в изотонической среде при 37°C устойчивы и осмотически нечувствительны для катехоламинов и АТФ.

В изотонической среде в отсутствие АТФ и  $Mg^{++}$  экзогенный норадреналин не обменивается с эндогенным (Hillagr, 1966). Эти факты указывают на то, что катехоламины в гранулах хранятся в недиффундирующей форме. Однако связанная форма норадреналина внутри СП или гранул чувствительна к изменению ионного состава среды. В гипотонических растворах из гранул или СП в инкубационную среду высвобождаются катехоламины, АТФ и белки. Процесс активного везикулярного захвата блокируется  $Ca^{++}$  (1—5 мМ).

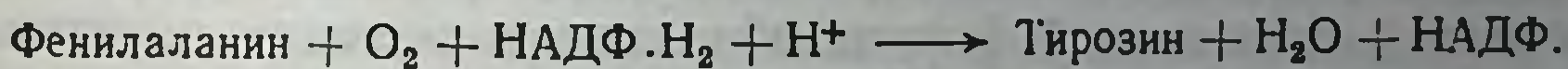
Способность норадреналина образовывать высокомолекулярные комплексы с АТФ в соотношении 4:1 (особенно в присутствии  $Mg^{++}$ ) показана методом ядерно-магнитного резонанса.

Предполагается, что норадреналин транспортируется в СП в виде его комплекса с АТФ, который внутри СП связывается с матрицей — хромогранинном.

## ОБМЕН КАТЕХОЛАМИНОВ

Из всех биогенных аминов скорость обмена норадреналина наименьшая. Так, величина  $t_{50}$  для гистамина составляет несколько минут, для серотонина — менее часа, для норадреналина — несколько часов (2—4 ч). Наблюдаются региональные колебания в значении  $t_{50}$  для норадреналина мозга. Имеются обратные отношения между скоростью обмена и эндогенным содержанием в различных областях мозга. Синтез норадреналина является многоступенчатым: тирозин → ДОФА → дофамин → норадреналин (Blaschko, 1938; Axelrod, 1966) и осуществляется главным образом в нервных окончаниях. Об этом свидетельствуют данные о субклеточном распределении катехоламинов и активности ферментов в нервных окончаниях, прямые опыты *in vivo* и *in vitro* по синтезу меченого норадреналина (или дофамина) в нервных окончаниях.

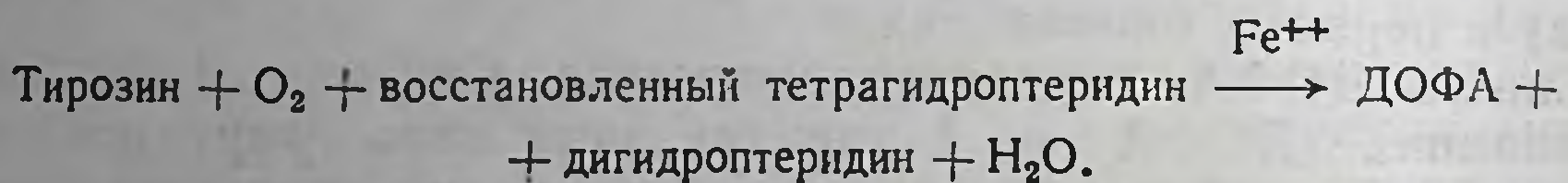
**Синтез ДОФА. Тирозингидроксилаза.** Синтез 3,4-диоксифенилаланина (ДОФА) из L-паратирозина катализируется тирозингидроксилазой — ферментом, отличным по своим свойствам от фенилаланингидроксилазы, который в цитоплазме клеток в присутствии птеридина в качестве кофактора способствует превращению фенилаланина в тирозин:



Тирозингидроксилаза локализована в норадреналин- и дофаминергических нейронах. Значительная активность ее обнаруживается в хвостатом ядре, подбугорной области, полосатом теле и в ядрах подкорки головного мозга животных. В мозге, симпатических нервах и надпочечниках фермент локализован преимущественно в цитозоле клеток, однако часть его связана с мембранами (Nagatsu, 1975). Допускается, что при выделении фракции фермент может соединяться с мембранами. Максимальная активность тирозингидроксилазы полосатого тела мозга крыс обнаружена в синапсосомах — до 80% (Coyle, Axelrod, 1972). Скорость гидроксилирования фенилаланина и тирозина в синапсосомах одинаковая, однако субстратное торможение было характерно лишь для последнего. В синапсосомах тирозингидроксилаза встречается в двух формах: большей части — растворимой и меньшей части — мембранно-связанной (Weipert et al., 1972). Некоторые авторы мембранно-связанную форму фермента (до 15—20%) находили в СП. Однако эти опыты нельзя, по-видимому, трактовать как доказательство локализации тирозингидроксилазы именно в СП. Учитывая способность

этого фермента к агрегации, при выделении фракции СП часть его может связываться с мембранами СП. Иммуногистохимическим методом показано (Pisker et al., 1975) скопление фермента в цитоплазме терминалей в виде волокнистых структур диаметром 22 нм и в цитоплазме нейронов на мембранах цитоплазматической сети и пластинчатого комплекса. Можно полагать, что свойства связанного фермента иные, чем растворимого.

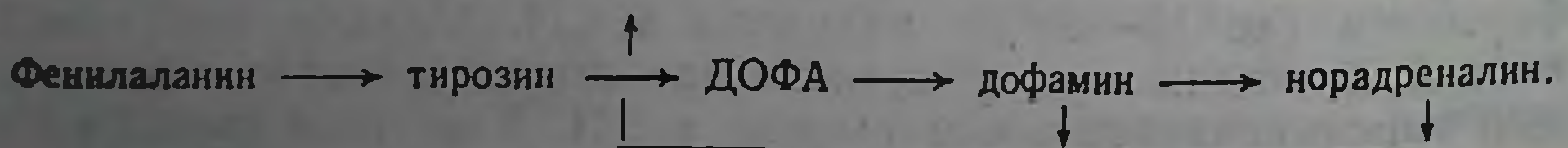
Из всех ферментов синтеза катехоламинов тирозингидроксилаза обладает самой высокой субстратной специфичностью. Субстратами ее являются тирозин и частично фенилаланин, но не тирамин и триптофан. Оптимум рН 5,9—6,5. Значение  $K_m$  для тирозина довольно низкое (около 50 мкМ), т. е. тирозингидроксилаза быстро насыщается субстратом и дальнейшее увеличение содержания тирозина не приводит к увеличению синтеза катехоламинов. Кофакторами фермента являются  $Fe^{++}$ , которые входят в активный центр фермента, и восстановленный тетрагидроптеридин в виде хиноидного таутомера. Сродство тирозингидроксилазы к птеридину увеличивается при усилении активности дофаминергических нейронов. Реакция синтеза ДОФА имеет следующий вид:



Ионы железа необходимы также для дезактивации образующихся перекисей. Механизм действия фермента еще полностью не выяснен. Предполагается, что в ходе реакции фермент из неактивной окисленной формы обратимо переходит в активную восстановленную форму. Дигидроптеридин-редуктаза катализирует превращение дигидроптеридина в его восстановленную форму. Гипофизарно-надпочечниковая система контролирует синтез тирозингидроксилазы.

При действии протеаз на очищенную растворимую тирозингидроксилазу (отн. мол. м.  $15 \cdot 10^4$ ) фермент диссоциирует на субъединицы с отн. мол. м.  $5 \cdot 10^4$  без изменения ферментативных свойств (В. З. Горкин, 1974). Очищенный и гомогенный фермент легко агрегирует до частиц с отн. мол. м.  $4 \cdot 10^5$ . Тирозингидроксилаза надпочечников активируется  $Na^+$  и тормозится  $K^+$  (Gutman, Segal, 1972).

Стадия образования ДОФА из тирозина является самой медленной реакцией биосинтеза норадреналина. Избыток конечных продуктов реакции (норадреналина и дофамина) может тормозить, а недостаток свободных катехоламинов в среде — увеличивать активность тирозингидроксилазы:



Тирозингидроксилаза синапсом тормозится норадреналином ( $10^{-6}$ — $10^{-5}$  М), дофамином и апоморфином (Ebstein et al., 1974).

Ингибиторами фермента являются комплексоны  $Fe^{++}$ , например  $\alpha$ ,  $\alpha'$ -дипиридил; аналоги L-аминокислот: фенилаланин, триптофан, ДОФА,  $\alpha$ -метил-ДОФА,  $\alpha$ -метил-паратирозин (действуют конкурентно с тирозином); катехоламины и L-5-окситриптофан, действующие конкурентно с птеридином. Синтез ДОФА тормозится при действии  $\alpha$ -метил-пара-тирозина, однако сам он гидроксилируется с образованием ложного медиатора — метараминола. Ионы кальция способны активировать фермент синапсом (Morgengoth et al., 1975).

**Синтез дофамина. ДОФА-декарбоксилаза.** Дофамин синтезируется из ДОФА при помощи соответствующей декарбоксилазы ароматических аминокислот — ДОФА-декарбоксилазы, открытой в 1938 г. Этот фермент обнаружен в моноаминергических нейронах. Он обладает широкой субстратной специфичностью, способен декарбоксиллировать ДОФА, 5-окситриптофан, тирозин, фенилаланин и гистидин. Иммунохимические данные указывают на то, что существует единая декарбоксилаза для синтеза катехоламинов и серотонина (James et al., 1972). Однако есть сведения, что декарбоксилазы ДОФА и 5-окситриптофана имеют разные оптимумы pH и температуры (Sims et al., 1973). Для ДОФА-декарбоксилазы характерна высокая избирательность в отношении основного субстрата — L-ДОФА. Экзогенный D-ДОФА в организме при помощи D-аминоксидазы может превращаться в 3,4-диоксифенилпируват, который далее при помощи L-аминотрансферазы превращается в L-ДОФА (Sougkes et al., 1964).

С простетической группой декарбоксилазы при участии SH-групп связан пиридоксальфосфат. Норадреналин может тормозить декарбоксилазу, при этом наблюдается реципрокные отношения между его уровнем в мозге и активностью пиридоксалькиназы. Последний фермент обнаружен в синапсомах. Глюкокортикоиды контролируют синтез и активность декарбоксилаз ароматических аминокислот. Механизм реакции декарбоксилрования еще не совсем ясен. ДОФА-декарбоксилаза (оптимум pH 6,7—7,0;  $K_m$  для ДОФА — 0,4 мМ) имеет отн. мол. м. для димера  $10$ — $11 \cdot 10^4$  (Fragoulis, Sekeris, 1975). При субклеточном фракционировании подбугорной области (Wgosh, Foppit, 1972) обнаруживаются два пула декарбоксилазы — в цитоплазматической фракции и в синапсомах, точнее в их цитоплазме. Высокая активность синтеза дофамина из  $^3H$ -ДОФА обнаружена в синапсомах хвостатого ядра мозга крыс. Блокаторами фермента служат структурные аналоги аминокислот ( $\alpha$ -метил-метатирозин), некоторые биогенные амины, производные гидразина и декаборан. Эффективным конкурентным ингибитором является  $\alpha$ -метил-ДОФА, который сам декар-

бокслируется до  $\alpha$ -метилдофамина (альдомет). Норадреналин и дофамин могут регулировать активность ДОФА-декарбоксилазы. Декарбоксилазы различных аминокислот обнаруживаются в капиллярах мозга, возможно, они регулируют проницаемость гематоэнцефалического барьера для аминокислот. Для ДОФА-декарбоксилазы доказано наличие конкурентного субстратного торможения.

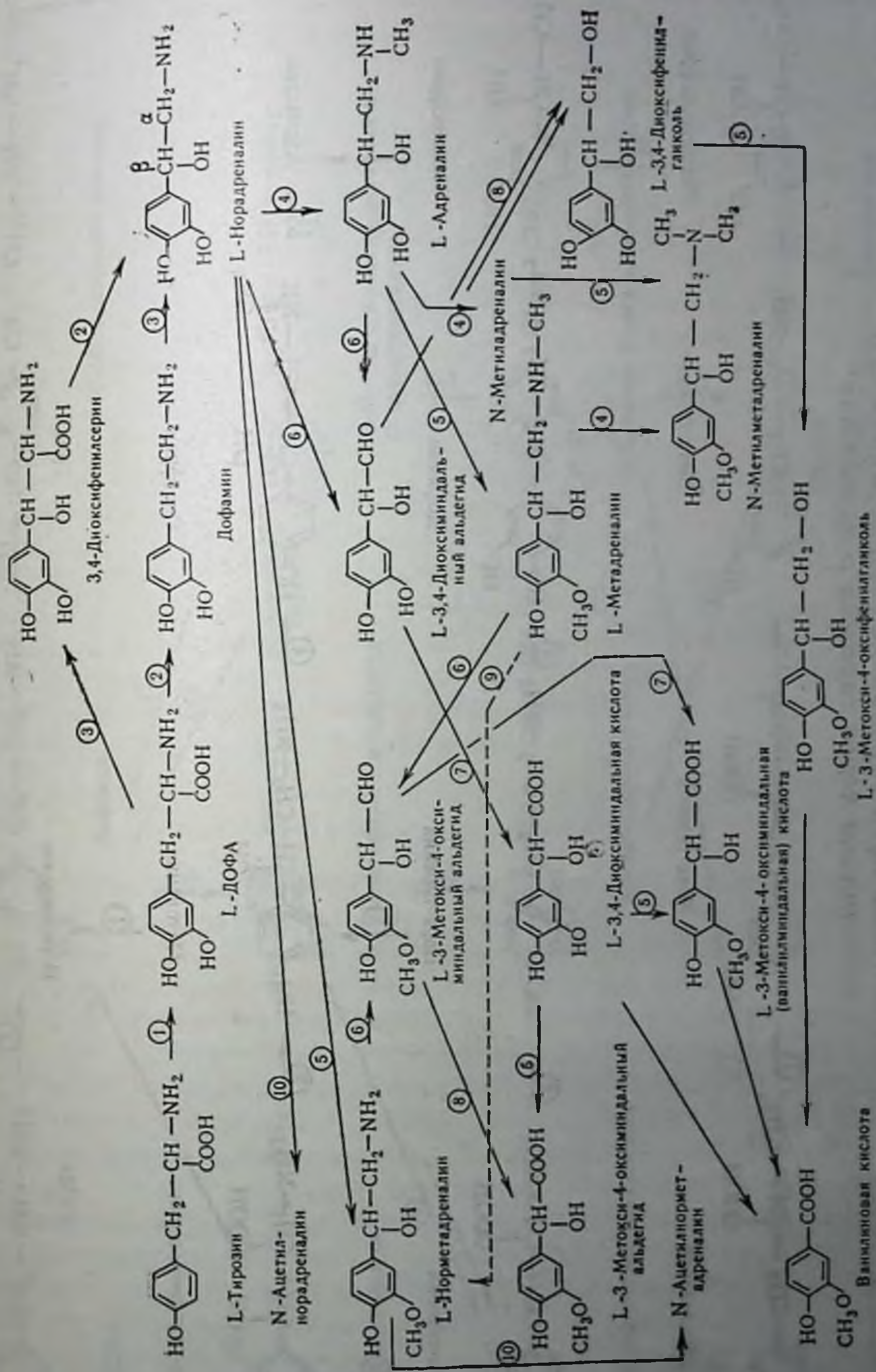
При введении животным больших доз триптофана декарбоксилаза ароматических аминокислот активируется, при этом у них наблюдается эйфория. При маниакальных состояниях активность ДОФА-декарбоксилазы увеличивается, а при паркинсонизме — уменьшается (Carlsson, 1958). При маниакальных и депрессивных психозах выявляется дефицит норадреналина и дофамина в мозге. Большие дозы резерпина могут провоцировать эти психозы. Терапевтический эффект оказывают при этих заболеваниях центральные ингибиторы МАО и трициклические антидепрессанты. Хотя патогенез паркинсонизма до сих пор полностью не расшифрован, выявлено главное звено — нарушение обмена дофамина, а именно его синтеза.

При паркинсонизме нарушена также конвергенция между холинергическим и дофаминергическим нейронами в системе черная субстанция — полосатое тело. Разрушение черной субстанции, иннервируемой холинергическими нервами, вызывает снижение содержания дофамина в полосатом теле, которое регулирует двигательные стереотипы. Стимуляция черной субстанции электрическим током вызывает накопление дофамина в хвостатом ядре. При паркинсонизме обнаружена повышенная чувствительность к ацетилхолину определенных структур мозга (дорсальная область черной субстанции). Для патогенеза паркинсонизма существенно накопление в мозге тирамина, триптамина и пара-оксифенилуксусной кислоты, которые (особенно последняя) снижают активность ДОФА-декарбоксилазы. При лечении паркинсонизма используют L-ДОФА, который проникает через гематоэнцефалический барьер. Высокие дозы ДОФА, способствуя локальному синтезу дофамина и норадреналина, вызывают в конце концов торможение активности тирозингидроксилазы, ресинтеза катехоламинов и реактивности дофаминовых рецепторов. Однако высокие дозы ДОФА все же способны оказывать в некоторых случаях благоприятный эффект, не увеличивая образование дофамина. Введение ДОФА может включать побочные пути его обмена. Так, ДОФА может превращаться в морфинподобные дофаминомиметические соединения, а именно в апоморфин и тетраоксиапоморфин. Ниже представлены схемы 6—9 обмена катехоламинов.

**Синтез норадреналина. Дофамин- $\beta$ -гидроксилаза.** Синтез норадреналина из дофамина осуществляется дофамин- $\beta$ -гидроксилазой. Распределение этого фермента коррелирует с региональным распределением норадреналина. Фермент является



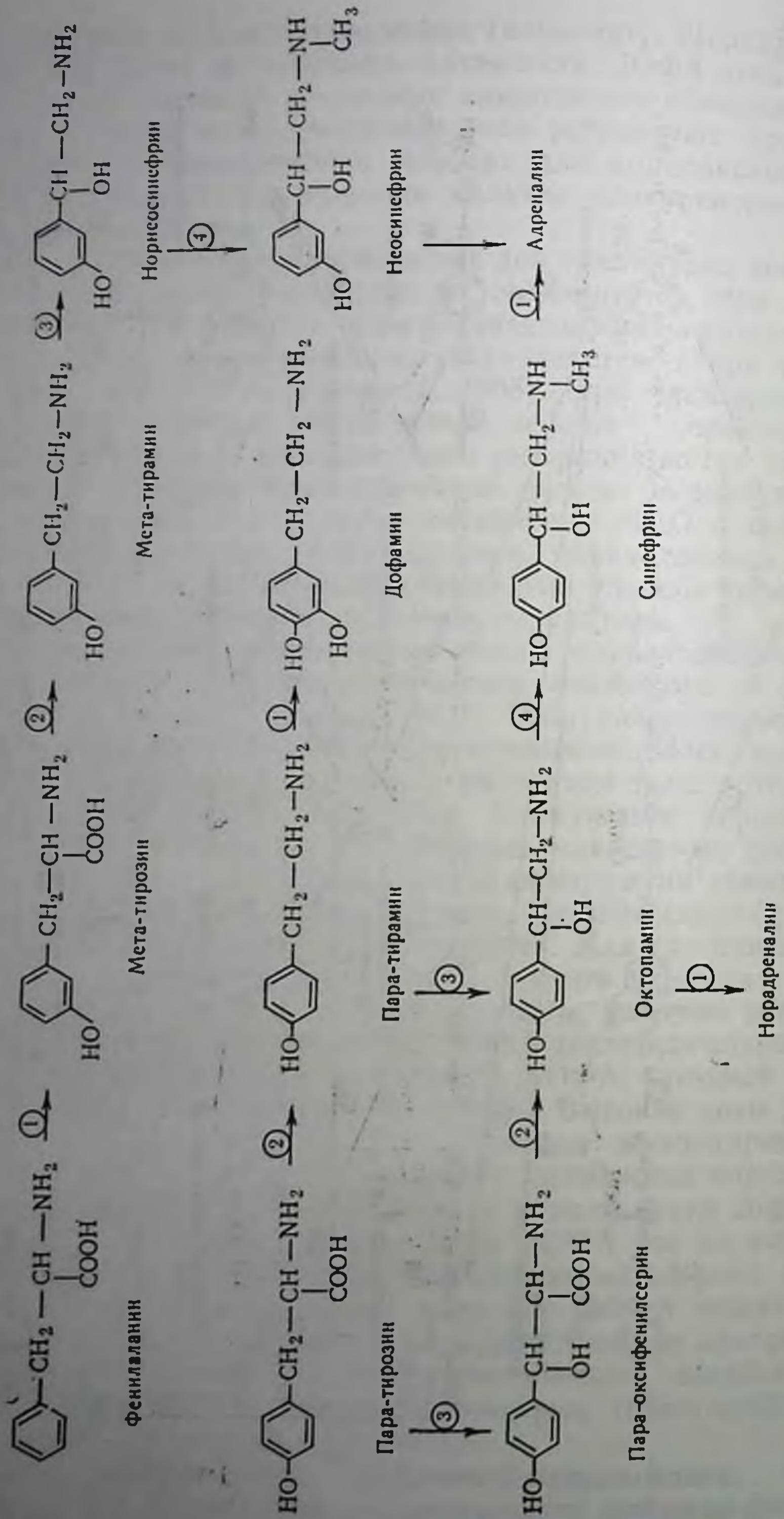
Схема 6. Обмен норадrenalина и адреналина



1 — тирозингидроксилаза; 2 — ДОФА-декарбоксилаза; 3 — дофамин-β-гидроксилаза; 4 — фенилэтанол-амин-N-метилтрансфераза; 5 — катехоламин-O-метилтрансфераза; 6 — MAO; 7 — альдегиддегидрогеназа; 8 — альдегидредуктаза; 9 — диметилирование; 10 — N-ацетилирование.

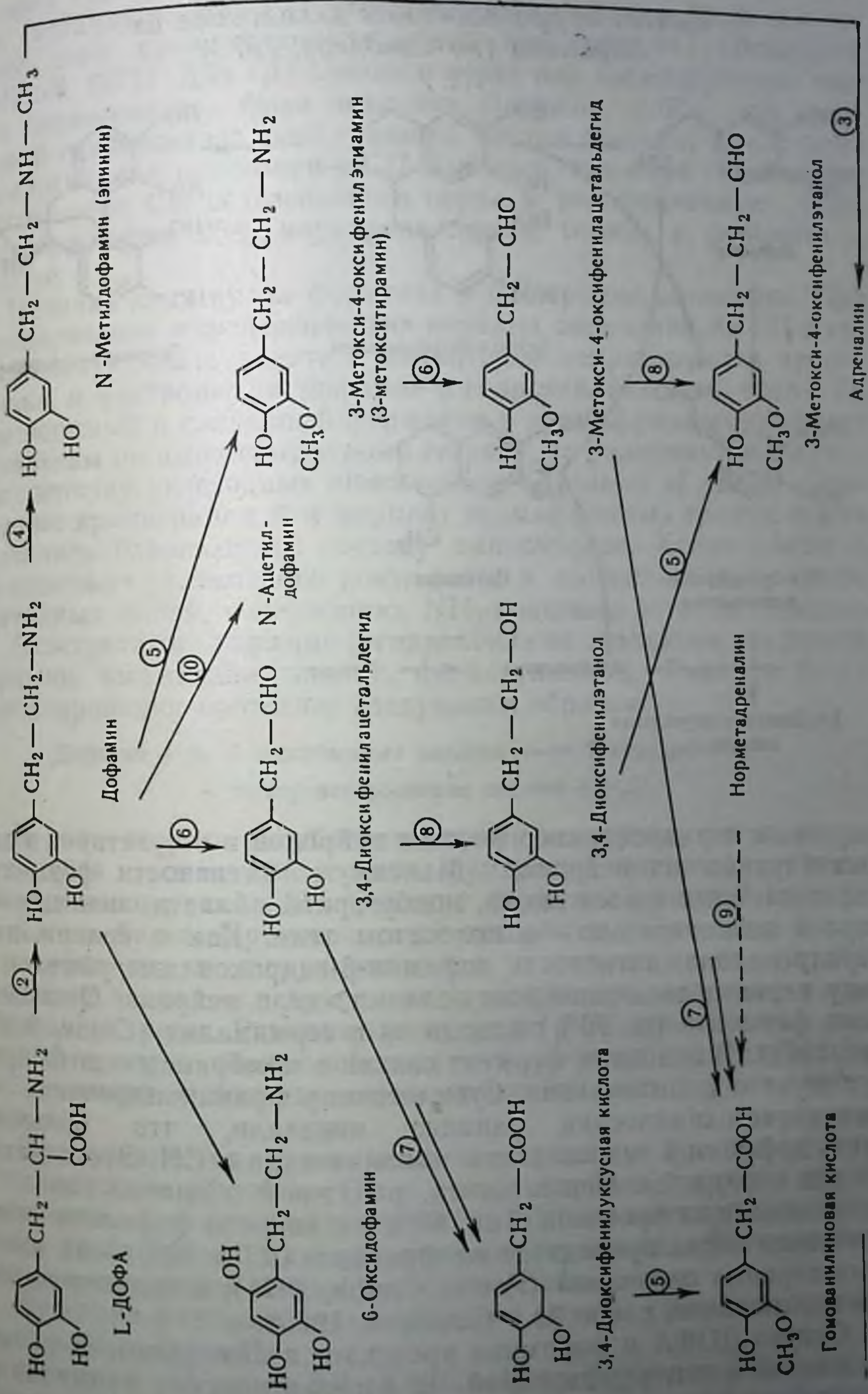
Схема 7

Побочные пути образования норадреналина и адреналина через тирамин и октопамин<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Обозначения те же, что и к схеме 6.

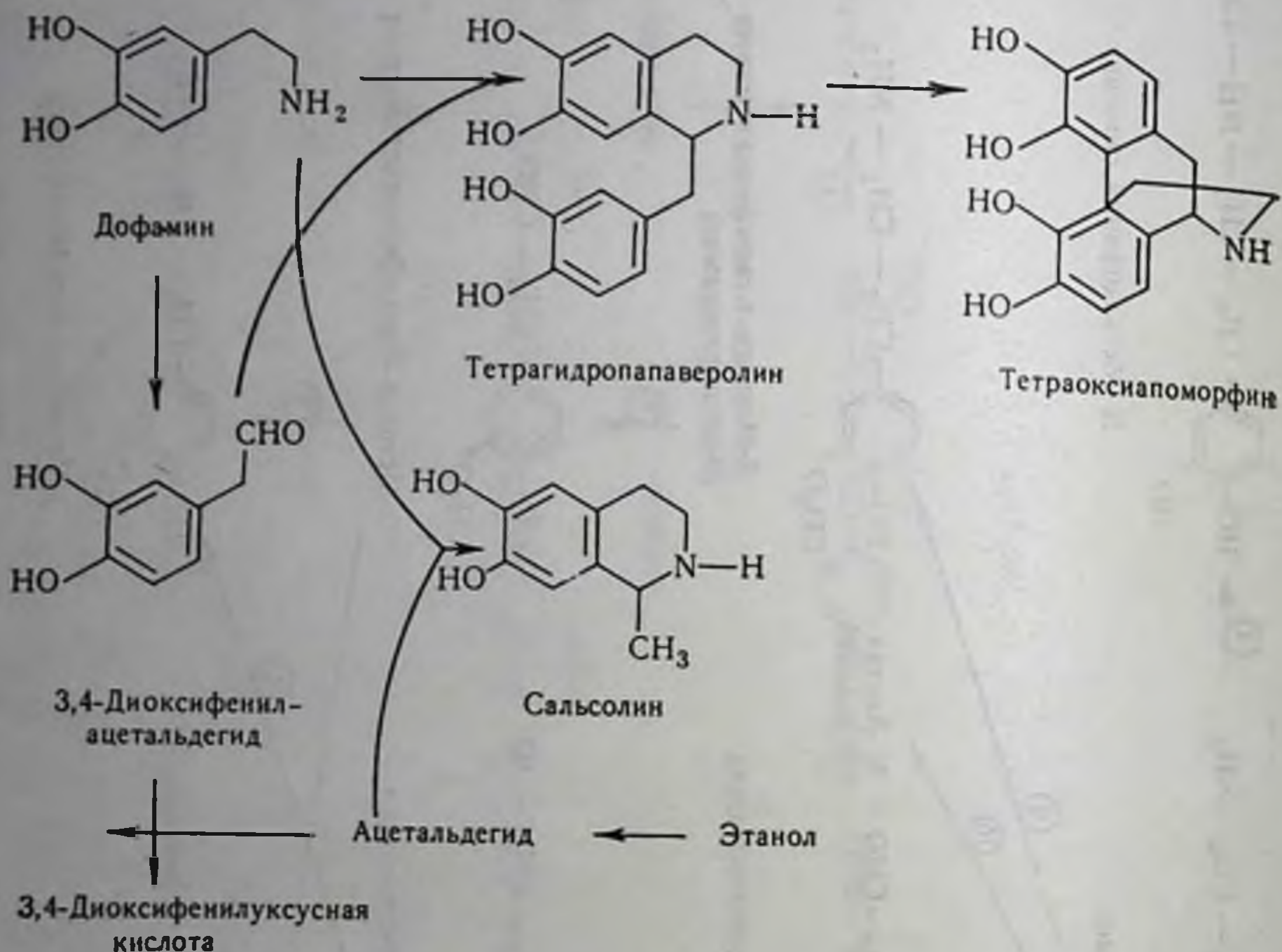
Схема 8. Обмен ДОФА и дофамина<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Обозначения те же, что и к схеме 6.

## Схема 9

### Синтез морфинподобных алкалоидов из дофамина (по Сэндлеру, 1976)



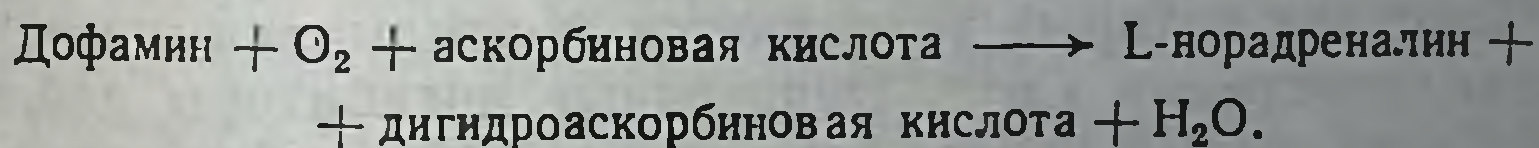
маркером норадреналинергических нейронов и отсутствует в дофаминергических нейронах. Максимум активности фермента определяется в стволе мозга, подбугорной области, меньше — в коре и незначительно — в полосатом теле. Как и содержание норадреналина, активность дофамин-β-гидроксилазы убывает в ряду нервных окончания > аксоплазма > тело нейрона. Основной фонд фермента (до 70%) находится в терминалях (Coyle, Axelrod, 1972). В основном фермент связан с мембранами, хотя присутствует и в цитоплазме. Субклеточное фракционирование и иммуногистохимический анализ показали, что большая часть дофамин-β-гидроксилазы локализована в СП. Это доказано для сердца, селезенки, мозга, радужной оболочки глаза и семявыносящих протоков. Так, 80% активности фермента селезеночного нерва приходится на фракцию СП и 20% — на цитозоль нервных окончаний (Potter, Chubb, 1971), в надпочечниках это соотношение равно 9:1 (Laduron, 1975).

Синтез ДОФА и дофамина протекает в цитоплазме нервных окончаний возле митохондрий. В адренергических терминалях количество митохондрий больше, чем, например, в холинергических синапсах.

Оказалось, что в СП существует два пула дофамин- $\beta$ -гидроксилазы: связанный с мембранами и свободный. В хромаффинных гранулах надпочечников свободного фермента больше, чем связанного. Для СП симпатических ганглиев крыс соотношение этих пулов фермента равно примерно 1:1 (Vgimijoin, Molinoff, 1971). Для СП чревного нерва или хромаффинных гранул надпочечников быка показано (Laduron, 1975), что дофамин- $\beta$ -гидроксилаза локализована внутри везикул, т. е. синтез норадреналина протекает в СП или гранулах. При гипоосмотическом шоке СП селезеночного нерва в инкубационную среду высвобождается 25% норадреналина и белка, а фермента — меньше.

Наличие двух пулов фермента в СП трудно объяснить. При деполяризации адренергических нервных окончаний из СП в синаптическую щель вместе с медиатором секретируются хромогранин и растворимая дофамин- $\beta$ -гидроксилаза (см. главу 7). Растворимый и связанный ферменты в хромаффинных гранулах одинаковы по аминокислотному составу, но различны по составу и количеству углеводных компонентов (Aupis et al., 1974). Очищенные хромогранин А и фермент хромаффинных гранул также оказались близкими по составу аминокислот. Хромогранин А не содержит углеводного компонента и состоит из двух полипептидных цепей, содержащих  $\text{NH}_2$ -концевые остатки лейцина.

Субстратами дофамин- $\beta$ -гидроксилазы являются дофамин, тирамин, амфетамин, эпинин, фенилэтиламин. Реакция  $\beta$ -гидроксилирования протекает следующим образом:



В роли второго косубстрата, кроме аскорбата, могут выступать, хотя и в меньшей степени, фумарат, а также ацетат в высоких концентрациях. В структуру фермента входят 2 моля Си на 1 моль белка. При недостатке аскорбата в организме синтез норадреналина не нарушается, что указывает на то, что этот кофактор заменяется другим восстановителем, например тетрагидроптеридином. Реакция проходит по типу «пинг-понга», т. е. первый продукт взаимодействия с ферментом — дигидроаскорбат приводит к последующему присоединению другого субстрата.

Предполагается, что в механизме реакции принимают участие активные радикалы  $\text{O}_2^-$  а роль аскорбата состоит в их образовании. Кофактором реакции *in vitro* является также каталаза, необходимая для разрушения перекисей, образующихся при аутоокислении дофамина и аскорбата.

Дофамин- $\beta$ -гидроксилаза обладает низким сродством к дофамину ( $K_m = 0,9$  мМ).

Оптimum рН равен 5,2—5,4. Свойства фермента надпочечников и сыворотки крови идентичны по кинетике, электрофорети-

ческой подвижности, но ферменты различны по иммунным свойствам. В структуру фермента сыворотки крови человека и мозгового слоя надпочечников быка входят углеводные компоненты (Wallace et al., 1974). Очищенный фермент надпочечников представляет собой гликопротеид, состоящий из 4 субъединиц (отн. мол. м.  $75 \cdot 10^3$ ), которые содержат 4 атома Cu.

На одну субъединицу приходится 7 остатков маннозы, 5 — N-ацетилглюкозамина, 2 — галактозы, 1 — фукозы и 1 — сиаловой кислоты. Углеводный компонент не входит в структуру активного и антигенного центров фермента и может способствовать его ориентации в мембранах хромаффинных гранул. Каждая субъединица дофамин- $\beta$ -гидроксилазы надпочечников состоит из двух полипептидных цепей с отн. мол. м.  $32 \cdot 10^3$  (Aupis et al., 1974). Свойства фермента мозга изучены мало.

Расчет скоростей промежуточных реакций синтеза показывает, что  $\beta$ -гидроксилирование является второй лимитирующей стадией синтеза норадреналина. Ингибиторами дофамин- $\beta$ -гидроксилазы являются: производные фенилэтиламина (бензилгидразин, бензилоксиямин, природный продукт допастин); некоторые пирокатехины и другие вещества ( $\alpha$ -метилдофамин, который является субстратом и образует ложный медиатор,  $\alpha$ -метил-метатирозин; диметилимипрамин, амфетамин, триптамин, производные трополона); хелатоны  $\text{Cu}^{++}$ : ЭДТА, гистидин, диэтилдитиокарбамат, тетурам, фузариновая кислота. Регуляция активности дофамин- $\beta$ -гидроксилазы осуществляется эндогенными ингибиторами — растворимыми белками (отн. мол. м. до  $4 \cdot 10^4$ ), действие которых устраняется N-этилмалеимидом,  $\text{Ca}^{++}$  и микроколичествами  $\text{Cu}^{++}$ . Эндогенные ингибиторы действуют либо на Cu-активный центр, либо на SH-группы фермента. Растворы с высокой ионной силой или 0,05% раствор тритона X-100 солюбилизируют и активируют дофамин- $\beta$ -гидроксилазу.

Активность дофамин- $\beta$ -гидроксилазы в мозге снижается при депрессивных состояниях, шизофрении и паркинсонизме.

Целесообразно еще раз указать на то, что дофаминергические нейроны в отличие от норадреналинергических не содержат дофамин- $\beta$ -гидроксилазы. В ходе филогенеза в определенных структурах появились факторы, репрессирующие синтез молекул этого фермента в норадреналинергическом нейроне, и нейрон стал дофаминергическим. В литературе отсутствуют сведения о том, что в критический момент функционирования дофаминергический нейрон превратился в норадреналинергический.

Регуляция синтеза катехоламинов. Биосинтез катехоламинов контролируется гормональными факторами и синаптической активностью. Основные пути регуляции универсальны и направлены на лимитирующие стадии синтеза (Э. Ш. Матлина, 1976). Можно выделить 4 основных фактора регуляции скорости синтеза катехоламинов.

Первый фактор — действие эндогенных активаторов и ингибиторов активности ферментов. Изменение тканевого уровня кофакторов ферментов синтеза норадреналина — тетрагидробиоптеридина, пиридоксаль-5-фосфата и аскорбата — достаточно адекватно определяет состояние активности соответствующих ферментов, однако существенно не сказывается на содержании катехоламинов в мозге и надпочечниках. Недостаток  $\text{Cu}^{++}$  и  $\text{Fe}^{++}$  в тканях или введение специфических хелатов снижает содержание катехоламинов в различных тканях.

Второй фактор — уровень субстратов в тканях. Различные воздействия, изменяющие содержание тирозина в ЦНС, уменьшают или соответственно увеличивают активность тирозингидроксилазы. Избыток тирозина в мозге не угнетает синтеза норадреналина.

Третий фактор — обратная регуляция активности ферментов конечным продуктом синтеза. Известно, что конечный продукт синтеза катехоламинов — норадреналин регулирует собственный синтез по механизму отрицательной обратной связи (Weiner, 1970). Избыток медиатора угнетает, а недостаток активирует тирозингидроксилазу. Такая конкуренция возможна *in situ* потому, что содержание птеридинов в ткани невысокое. Любопытно, что некоторые метаболиты норадреналина (например, 3,4-диоксифенилгликоль) также способны тормозить тирозингидроксилазу ткани сердца. В условиях локального торможения тирозингидроксилазы адренергические нейроны могут переключать обмен тирозина с синтеза норадреналина на синтез продуктов его переаминирования.

Рассмотрим пути увеличения свободного норадреналина в терминалях, т. е. пути торможения тирозингидроксилазы и уменьшения скорости синтеза катехоламинов (Weiner et al., 1972). Угнетающее действие избытка свободного внутринейронального норадреналина на его синтез можно получить при: а) действии ингибиторов МАО, при этом последующее добавление меченого L-ДОФА приводит к увеличению синтеза норадреналина, что указывает на то, что исходное торможение синтеза было на стадии тирозин → ДОФА; б) действии симпатомиметических аминов, так называемых ложных медиаторов (тирамин или амфетамин), которые способны замещать норадреналин в гранулах и тем самым высвободить его в цитозоль терминалей, сами же амины в используемых дозах непосредственно не влияют на активность тирозингидроксилазы; в) действии блокаторов везикулярного захвата норадреналина и дофамина, например при введении малых доз резерпина; г) действии веществ, блокирующих проводимость и деполяризацию пре-СМ, вследствие чего тормозится вызванная секреция медиатора, например бретилия, который непосредственно не влияет на тирозингидроксилазу и, кроме того, способен ингибировать МАО и высвободить норадреналин из СП в цитозоль нервных окончаний.

чаний; д) насыщении тканей норадреналином и L-ДОФА. Ускорение синтеза норадреналина наблюдается при возбуждении адренергических нервных окончаний, при денервации, химической симпатэктомии, вызванной 6-оксидофамином (Mueller et al., 1969). В плане обратных пре- и постсинаптических влияний следует отметить, что постганглионарная денервация симпатических нервов сердца вызывает потерю способности синтеза норадреналина из тирозина и дофамина (Potter et al., 1965). В основе изменения скорости синтеза катехоламинов при блокировании или соответственно стимуляции адренорецепторов также лежит механизм краткосрочной отрицательной обратной связи (Б. Н. Манухин, Е. В. Волина, 1975).

Четвертый фактор — индукция синтеза ферментов. Снижение концентрации свободного внутринейронального норадреналина может не только контролировать активность тирозингидроксилазы, но и давать сигнал (пока не ясно, каким образом) к ресинтезу ферментов, лимитирующих синтез норадреналина. Свободный внутриклеточный медиатор может влиять на триаду ДНК—РНК—белок. Например, ДНК, предварительно обработанная норадреналином, активировывает ДНК-зависимую РНК-полимеразу (Yamafuji et al., 1972). В опытах *in vitro* норадреналин вызывает гипохромный эффект в ДНК и РНК. Изменения содержания катехоламинов в мозге, вызванные психотропными веществами, отражаются на скорости обмена ядерной РНК. На основании этих данных А. М. Бару (1972) предполагает дерепрессорную функцию норадреналина. Такой тип регуляции синтеза катехоламинов происходит под влиянием гормонов и длительной синаптической активности адренергических синапсов. Впервые такая регуляция при длительном введении резерпина была описана Axelrod (1970). При этом значительно снижается содержание катехоламинов в симпатических нервах и надпочечниках за счет постоянного действия MAO при высвобождении норадреналина из СП или гранул, а также увеличивается активность в тканях животных тирозингидроксилазы и дофамин-β-гидроксилазы. В итоге ускоряется синтез норадреналина. Повышение активности тирозингидроксилазы при этом блокировалось циклогексимидом, что свидетельствовало об индукции фермента (Thoenen et al., 1970). Эффект резерпина снимается при децентрализации верхнего шейного ганглия, введении периферических адренолитических средств, денервации надпочечников. При добавлении в культуру ткани надпочечников крыс актиномина D или кортикостероидов до последующей обработки резерпином эффект индукции тирозингидроксилазы не наблюдается (Goodman et al., 1975).

Можно полагать, что аксоток ферментов синтеза норадреналина является также определяющим механизмом, обеспечивающим ускорение синтеза катехоламинов в нервных окончаниях. Эти опыты поставили ряд вопросов, пока еще нерешен-



ных. Во-первых, каков биологический смысл поддержания продукции свободного норадреналина, когда его содержание снижается? Во-вторых, ресинтез ферментов происходит в аксонах, терминалях либо в теле нейрона; в последнем случае не ясно, кто дает «сигнал» о начале синтеза ферментов? Может быть, обратный аксоток НРФ или «опустошенных» СП. В-третьих, сигнал об увеличении синтеза дается через активатор либо через дерепрессию ингибитора синтеза ферментов? Подкожное введение крысам резерпина вызывает снижение содержания цАМФ в мозге (П. А. Кометиани, 1976). Эти данные указывают скорее всего на дерепрессию синтеза ферментов. По другим данным (Otten et al., 1974), содержание цАМФ не меняется в симпатических ганглиях крыс в условиях, которые приводят к индукции тирозингидроксилазы (плавание, холодный стресс, обработка резерпином).

При синаптической активности синтез катехоламинов быстро регулируется по типу отрицательной обратной связи и медленно регулируется при помощи индукции синтеза ферментов, участвующих в продукции норадреналина (табл. 14). Можно отметить два типа индукции ферментов: при проведении нервного импульса (синаптосомы мозга животных) или транссинаптическом действии ацетилхолина на пресинаптические Н-холинорецепторы надпочечников и постганглионарных нейронов.

Во многих работах подчеркивается факт, что стимуляция тирозингидроксилазы в постсинаптическом нейроне наступает спустя несколько часов после сравнительно быстрых изменений в уровнях цАМФ и АДЦ-азы. По мнению Thoenen (1974), в дифференцировке адренергических структур в онтогенезе основная роль принадлежит генетически детерминированной транссинаптической индукции, а не неизвестному трофогену, освобождающемуся из холинергических терминалей.

В ЦНС под влиянием гипофизэктомии отмечается торможение синтеза дофамина в полосатом теле и норадреналина в подбугорной области. При введении АКТГ в мозге крыс усиливается синтез норадреналина. На синтез катехоламинов в мозге и надпочечниках оказывают влияние и другие гормоны (инсулин, тироксин, половые гормоны), а также ангиотензин.

**Моноаминоксидаза (МАО).** Моноаминоксидаза, открытая в 1928 г., является хорошо изученным ферментом, катализирующим распад биогенных аминов и поддерживающим на определенном физиологическом уровне содержание катехоламинов, серотонина и гистамина в нервных окончаниях (А. Ю. Буданцев, 1976). В ЦНС инактивация биогенных аминов в гораздо большей степени осуществляется МАО, чем катехоламин-О-метилтрансферазой, в периферической нервной системе существуют обратные отношения.

В мозге МАО больше всего в подбугорной области, зрительном бугре, продолговатом мозге и морском коньке и меньше —

## Синаптическая активность и синтез катехоламинов

Таблица 14

Объект	Воздействие	Эффект	Авторы
Надпочечники	<p>Стимуляция электрическим током брюшного нерва</p> <p>Холодовый стресс (4 °С)</p> <p>Введение ацетилхолина или Н-холиномиметиков (карбохолин)</p> <p>Денервация холинергических волокон</p> <p>То же</p> <p>Введение Н-холинолитиков</p>	<p>Активация фенилэтиламин-N-метилтрансферазы. Наряду с интенсивной секрецией катехоламинов их содержание в ткани снижается незначительно</p> <p>Первоначальное увеличение содержания цАМФ и цГМФ, активация протеинкиназы и последующая активация тирозингидроксилазы</p> <p>Увеличение уровня цАМФ и цГМФ и последующая активация тирозингидроксилазы</p> <p>Более умеренное нарастание активности цАМФ-зависимой протеинкиназы наряду с уменьшением активности тирозингидроксилазы. Резерпин в этих условиях не вызывает ее индукции</p> <p>Введение высоких доз ацетилхолина или карбахола стимулирует тирозингидроксилазу после денервации</p> <p>Снижение активности тирозингидроксилазы, вызванной холиномиметиками</p> <p>Уменьшение транссинаптической индукции синтеза тирозингидроксилазы и дофамин-β-гидроксилазы</p> <p>Эффект активации тирозингидроксилазы и накопления цАМФ отсутствует</p>	<p>Bülbring, 1949; Holland, Schümann, 1956</p> <p>Guidotti et al., 1975; Hapbauer, et al., 1975</p> <p>Guidotti, Costa, 1973</p> <p>Thoenen et al., 1973</p> <p>Thoenen et al., 1969</p> <p>Costa et al., 1974; Hapbauer et al., 1975</p>
Верхний шейный симпатический ганглий животных	Перерезка ганглионарного нерва	Введение карбохолина	

Введение адреналина или  $\beta$ -ад-  
ренормиметиков (изадрин)  
Действие резерпина

КСI (40—54 мМ) или дибутл-  
рил-цАМФ (0,1 мМ)

То же

Стимуляция электрическим  
током

КСI (45 мМ)

Дибутрил-цАМФ или НРФ

Препарат подчрев-  
ный нерв — семья-  
выносящие про-  
токи морских сви-  
нок

Активация тирозингидроксилазы опосредо-  
вана через систему цАМФ  
Индукция синтеза тирозингидроксилазы,  
блокируемая циклогексимидом или холино-  
литиками

Стимуляция тирозингидроксилазы, дофа-  
мин- $\beta$ -гидроксилазы, частично МАО и  
ДОФА-декарбоксилазы, а также обновле-  
ния суммарных белков (последний эффект  
только для калиевой деполяризации). Эф-  
фекты снимались циклогексимидом, активно-  
мицином D и наблюдались на целом ганг-  
лии и в культуре ткани

Активация тирозингидроксилазы. Эффект  
усиливается при действии НРФ

Стимуляция МАО, эффект снимается НРФ

Стимуляция МАО

Увеличение интенсивности синтеза  $^3\text{H}$ -нор-  
адреналина из тирозина, но не из ДОФА  
(за исключением больших концентраций)  
и дофамина. Увеличение активности лтери-  
дин-редуктазы. Эффект снимается при до-  
бавлении норадреналина до начала возбуж-  
дения. Резкое усиление синтеза норадрена-  
лина после периода стимуляции током, при  
этом активность тирозингидроксилазы не  
изменяется. Пуromини (но не циклогекси-  
мид или активомини D) не влияют на син-  
тез медиатора в период возбуждения, но  
снижает резкое увеличение синтеза после  
периода возбуждения

Axelrod, 1972

Maskey, 1974; Goodman  
et al., 1974

Maskey, 1974

Phillipson, Sandler, 1975

Roth et al., 1966; Weiner  
et al., 1971; Thoa et al.,  
1971

Объект	Воздействие	Эффект	Авторы
Селезеночный нерв кошек	Стимуляция электрическим током или КСI (52 мМ)	Са-зависимая активация тирозингидроксилазы, при этом снижается величина $K_m$ для тирозина	Morgenroth et al., 1971
Селезеночный нерв кошек	Стимуляция электрическим током	Увеличение интенсивности синтеза 3Н-норадреналина из тирозина. Стимуляция тирозингидроксилазы и дофамин- $\beta$ -гидроксилазы наряду с увеличением количества крупных СП	Blakeley et al., 1968; Fil- lenz, 1972
То же	Стимуляция электрическим током	Повышение частоты и интенсивности нервных импульсов увеличивает активность дофамин- $\beta$ -гидроксилазы	Smith, 1973
То же	Дибутрил-цАМФ	Активация дофамин- $\beta$ -гидроксилазы	Cubeddu et al., 1975
Сердце крыс, кошек	Действие $\alpha$ -адренолитика (фел-толамин)	Повышение секреции норадреналина (благодаря выключению пресинаптического $\alpha$ -адренорецептора) и активности дофамин- $\beta$ -гидроксилазы	Cubeddu et al., 1975
Сердце крыс, кошек	Стимуляция электрическим током звездчатого ганглия	Увеличение синтеза норадреналина из тирозина, но не из ДОФА или дофаминна	Gordon et al., 1966
Действие ангиотензина	Действие ангиотензина	Секреция норадреналина из срезов и активация дофамин- $\beta$ -гидроксилазы, последний эффект снимается пуромидином, но не актиномицином D	Chevillard et al., 1975

Морской обезьян	конек	Стимуляция электрическим током (in vivo)	Алlostерическая активация тирозингидроксилазы, при этом резко увеличивается $K_m$ длянорадреналина	Roth et al., 1974
Мозг крыс		Денервация адренергических терминалей при помощи 6-окси-дофамина Введение резерпина	Торможение тирозингидроксилазы и потеря способности к обучению	Mason, Iversen, 1974
Черная субстанция мозга крыс		Стимуляция электрическим током (in vivo)	Активация тирозингидроксилазы цитозоля ткани хвостатого ядра	Schelhuber et al., 1975
Срезы или синаптосомы полосатого тела мозга крыс		КСI (40—50 мМ) или стимуляция электрическим током (10 мин)	Са <sup>++</sup> -зависимый ресинтез дофамина. Са <sup>++</sup> активируют тирозингидроксилазу. Литики (в том числе нейролептики) или миметики (апоморфин) дофаминового рецептора, возможно пре-СМ, регулируют изменение активности фермента	Roth et al., 1974; Haggis et al., 1975; de Bellegoche et al., 1976
Срезы подбугорной области мозга крыс		То же	Са-независимая активация тирозингидроксилазы. цАМФ не влияет. Убаин усиливает действие дибутирил-цАМФ. Снижение величины $K_m$ для тирозина и птеридина. Эффект ослабляется дофаминолитиками	Haggis et al., 1975; Moggenboth et al., 1975; Goldstein et al., 1976
Синаптосомы ствола мозга крыс		Действие Н-холлинolitikов Стимуляция электрическим током (5 мин)	Активация тирозингидроксилазы опосредована через протеникиназу Снижение активности тирозингидроксилазы Са-зависимое увеличение содержания норрадреналина в синаптосомах паряду с секрецией его в среду	McKelvy, 1975 Thoenen et al., 1973 В. И. Родина и др. (1977)

в мозжечке и мозолистом теле. Максимум активности МАО совпадает с содержанием биогенных аминов в моноаминергических нейронах мозга. В мозге и сердце, помимо МАО, может встретиться другой фермент, участвующий в обмене катехоламинов, — моноаминтетразолий-редуктаза. Это фермент в отличие от МАО не тормозится транилципрамином, и акцептором водорода при этом является не кислород, как в случае МАО, а другое соединение.

Поскольку в мозге МАО в основном (до 60—80%) определяется в митохондриях, ее считают маркерным ферментом митохондрий. МАО является мембранно-связанным ферментом, локализованным во внешних мембранах митохондрий, которые непроницаемы для аминов. В мембране нейрональных митохондрий МАО связан с кислыми фосфолипидами, главным образом с кардиолипином (Goridis, Neff, 1971). Солюбилизация МАО протекает легче, если предварительно из митохондрий удалить кислые фосфолипиды, и, наоборот, добавление этих липидов в экстрагирующую смесь (детергенты) затрудняет этот процесс.

В тканях мозга и сердца максимум активности МАО определяется в свободных митохондриях и несколько меньше — в синапсосомах, но активность МАО в синаптических митохондриях выше, чем в свободных (Fahn et al., 1969).

Активность МАО выявляется в основном в «тяжелых» синапсосомах (Р. Н. Глебов и др., 1971; Jaggott, Iversen, 1968). Гетерогенность митохондрий мозга объясняет множественность типов МАО, окисляющих тот или иной биогенный амин (Sinha, Rose, 1972). Так, в крупных синапсосомах МАО дезаминирует преимущественно серотонин. Структура этих синапсосом отличается от синапсосом, где МАО дезаминирует норадреналин. Внесинаптические митохондрии нейронов и глии содержат МАО, окисляющую кинурамин.

В плазматических мембранах, в частности в пре- и пост-СМ мозга животных, МАО отсутствует. Наличие некоторой активности МАО в микросомах можно объяснить возможностью ее синтеза в мембранах зернистой цитоплазматической сети с последующим переносом в митохондрии. После торможения МАО мозга ипрониазидом активность ее в микросомах становится более высокой, чем в митохондриях.

Субстратом МАО тканей животных являются первичные, вторичные и, частично, третичные амины. МАО в отличие от диаминооксидазы не ингибируется цианидами и карбонильными реагентами (тиосемикарбазид) и имеет флавидинуклеотид в качестве простетической группы. Диаминооксидаза окисляет только первичные амины и в качестве простетической группы имеет пиридоксальфосфат. МАО участвует в окислительном дезаминировании биогенных аминов:



В отношении субстратов МАО малоспецифична. Как правило, мозговая МАО дезаминирует биогенные амины в следующем порядке: тирамин > норадреналин > дофамин > серотонин > триптамин > адреналин.

МАО плохо окисляет третичные амины и совсем не окисляет четвертичные. Некоторые амины, такие, как  $\beta$ -фенилэтиламин,  $\alpha$ -СН<sub>3</sub>-триптамин, амфетамин или эфедрин, являются ингибиторами этого фермента. Для митохондриальной МАО характерна региональная и видовая субстратная специфичность. Ингибиторы МАО по-разному влияют на активность фермента в зависимости от ее регионального происхождения. Например, транилципрамин значительно тормозит окисление дофамина в хвостатом ядре, а хлоргилин и изокарбазид слабо тормозят активность МАО в отношении дофамина. Хлоргилин и гармин тормозят МАО при использовании норадреналина и серотонина и частично дофамина и триптамина; депренил тормозит МАО в основном в отношении дофамина и бензиламина; ипрониазид ингибирует оба типа МАО.  $\beta$ -Фенилэтилгидразин ингибирует преимущественно «серотониновую» МАО, а N-метил-N-бензилпропиламин — преимущественно «дофаминовую» МАО (В. З. Горкин, 1976). При изучении МАО мозга и симпатических нервов крыс установлено, что тормозимая хлоргилином МАО является «серотониновой», а не чувствительная к хлоргилину МАО — «тираминовой». Оба типа МАО различаются региональным распределением. Эти факты позволяют предполагать, что каждый медиатор имеет «свою» МАО. Таким образом, исследование множественности МАО имеет не только теоретическое значение, но и практическое для рационального поиска ингибиторов МАО с целью применения их при лечении различных нервных расстройств, связанных с нарушениями обмена биогенных аминов.

Введение ингибиторов МАО, особенно в сочетании с предшественниками, проникающим через гематоэнцефалический барьер, приводит к увеличению содержания медиаторов в мозге и нервных окончаниях. Наиболее эффективными ингибиторами МАО являются производные гидразина (ипрониазид, фенелзин, ниаламид) и третичный амин — паргилин. В частности, паргилин значительно ингибирует МАО мозга в довольно низкой концентрации (1 мкМ). Эти ингибиторы МАО также являются антидепрессантами. Менее изучены активаторы МАО. Известно лишь, что циклосерин способен активировать МАО. Для очищенной солюбилизированной МАО митохондрий мозга оптимум рН составляет 7,4—9,0, отн. мол. м. до  $4 \cdot 10^5$ . По-видимому, отн. мол. м. мономера составляет  $1 \cdot 10^5$ , т. е. МАО является олигомером (Tipton, 1968). При электрофорезе изоферменты МАО (2—5) движутся преимущественно к аноду, катодным изоферментом является только «дофаминовая» МАО митохондрий ствола мозга крыс (Youdim et al., 1973). Исследованные изо-

ферменты МАО мозга отличаются по субстратной и ингибиторной специфичности, по относительной молекулярной массе, оптимуму рН, значению  $K_m$ , устойчивости к температуре и хранению. Сходные антигены с изоферментами МАО печени имеют 80% МАО мозга быка, остальные 20% являются «специфическими» для мозга и обнаруживаются в основном в синаптосомах (Sandler, Youdim, 1972). Количество изоферментов МАО в мозге увеличивается в ходе онтогенеза. Данные по прямому обнаружению и исследованию изоферментов МАО свидетельствуют в пользу гипотезы о том, что норадреналин, серотонин и дофамин окисляются каждый «своей» МАО. Определенным недостатком исследований по множественности МАО является то, что в большинстве случаев используется растворимый ее препарат, в то время как большая часть МАО остается связанной с мембранами митохондрий.

Тиоловые реагенты тормозят МАО, а глутатион и субстраты МАО предотвращают этот эффект. По данным В. З. Горкина (1976), МАО митохондрий печени при действии различных окислителей SH-групп (ненасыщенные жирные кислоты, перекиси липидов,  $H_2O_2$  и  $Cu^{++}$ ) трансформируется в диаминооксидазу. Другими словами, МАО после окисления SH-групп (по-видимому, вне каталитического центра) и образования —S—S-связей замедляет дезаминирование «нормальных для себя» биогенных аминов и приобретает способность дезаминировать некоторые диамины (например, гистамин). Карбонильные реагенты тормозят индуцированную активность, а такие восстановители, как боргидрат Na, дитиотрейтол, устраняют трансформацию МАО, т. е. «индуцированная» диаминооксидаза снова становится «нормальной» МАО. Трансформация МАО, открытая В. З. Горкиным в 1968 г., может играть важную роль в патологии моноаминергических нейронов.

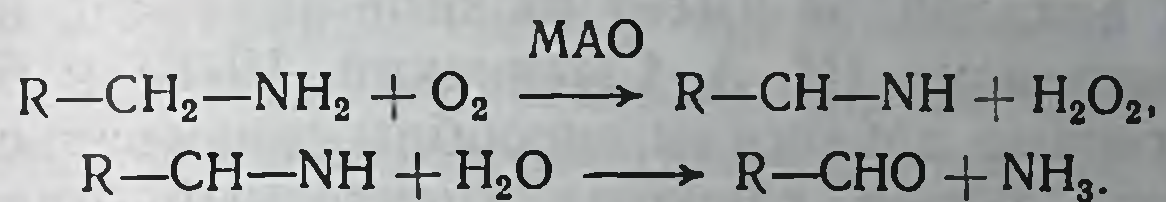
В состав активного центра МАО в качестве простетической группы входит флавинадениннуклеотид (ФАД) в соотношении 1 моль ФАД на 1 моль белка. При фермент-субстратном взаимодействии ФАД восстанавливается. В положении 8- $\alpha$ -изоаллоксазинового кольца ФАД ковалентно связан тиоэфирной связью с остатком SH-группы цистеина белка. В активный центр МАО печени входит следующая последовательность аминокислот: [-сер-гли-гли-цис(ФАД)-тир].

МАО мозга и других тканей является металлоферментом, в структуру которого входят либо  $Cu^{++}$ , либо  $Fe^{++}$ , ковалентно связанные с белком. Хелатирующие агенты (например, 8-оксихинолин, диэтилдитиокарбамат) тормозят активность МАО мозга, а последующее добавление  $Cu^{++}$  или  $Zn^{++}$  после удаления хелатонов диализом приводит к реактивации фермента. Ингибирующее необратимое действие ипрониазида в отношении МАО объясняется его хелатирующей способностью. В состав активного центра МАО входит электрофильная группа, содер-



жащая  $\text{Cu}^{++}$ , и нуклеофильная группа, содержащая ФАД и аминокислотный участок.

Предполагается, что такие субстраты, как серотонин и конкурентные ингибиторы МАО, вступают во взаимодействие с ферментом в незаряженной (непротонированной) форме. Активная электрофильная группа представляет собой комплекс  $\text{Cu}^{++}$  с белком и с азотом или с карбонильной группой соответственно в 3-м или 4-м положении молекулы флавина. Большинство ингибиторов МАО, по-видимому, реагирует с этим активным центром. В состав нуклеофильного центра, возможно, входит 10-й атом (азот) изоаллоксазиновой части флавина. Окислительное дезаминирование протекает в два этапа: ферментативное образование имина, который затем неферментативным путем гидролизуется в альдегид и аммиак:



Каталитический акт начинается взаимодействием амина с электрофильным центром молекулы МАО, после образования фермент-субстратного комплекса вследствие изменения конформации каталитической поверхности фермента другой активный центр (может состоять из двух группировок) акцептирует протон  $\alpha$ -углеродного атома амина с образованием имина. Механизм реакции окислительного дезаминирования полностью неясен.

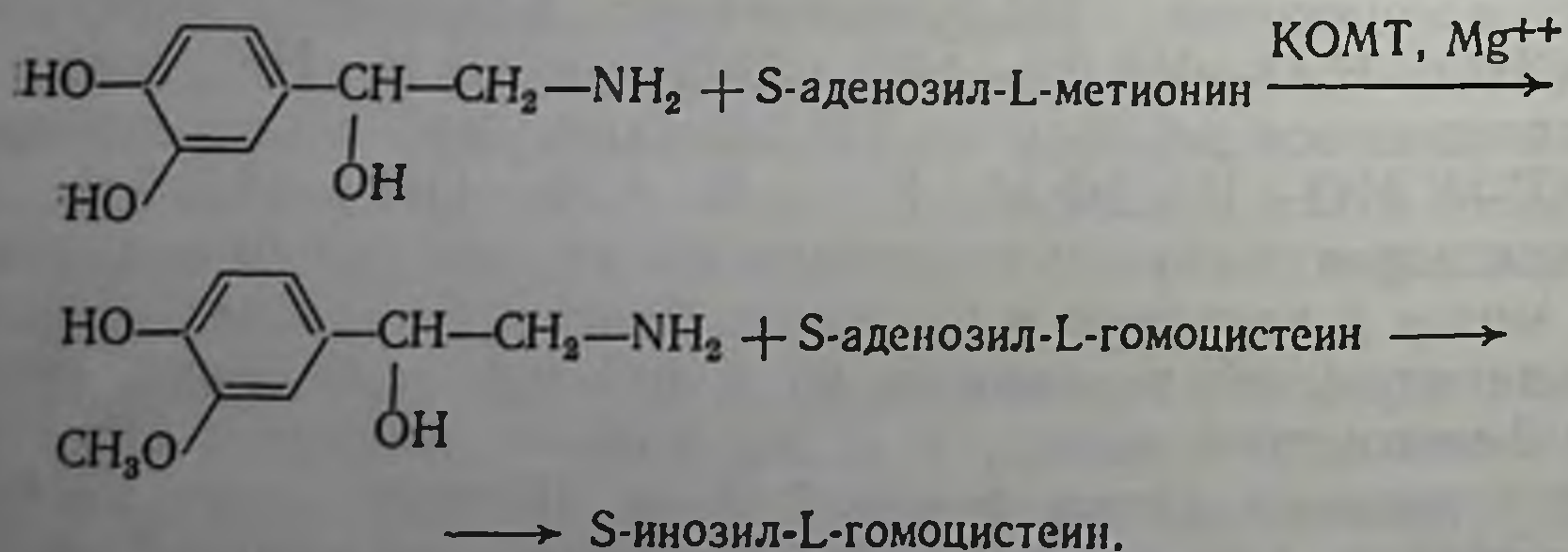
**Биогенные альдегиды.** Если метоксипроизводные биогенных аминов отражают уровень секреции различных форм аминов, попадающих в кровоток и т. д., то продукты окислительного дезаминирования катехоламинов отражают их внутринейрональный обмен. Промежуточные продукты расщепления катехоламинов — биогенные альдегиды (см. схемы 6—8) либо окисляются до кислот НАД-зависимой альдегиддегидрогеназой ( $\text{R-CHO} + \text{H}_2\text{O} + \text{НАД}^+ \longrightarrow \text{R-COOH} + \text{НАД.H} + \text{H}^+$ ), либо восстанавливаются до спиртов НАДФ-зависимой альдегидредуктазой ( $\text{R-CHO} + \text{НАДФ.H} + \text{H}^+ \longrightarrow \text{R-CH}_2\text{-OH} + \text{НАДФ}^+$ ). Альдегиддегидрогеназа локализована преимущественно в митохондриях мозга и частично в цитозоле. Фермент обладает сродством к альдегидам, образованным из дофамина, серотонина, тирамина и 3-метокситирамина, т. е. из аминов, имеющих ОН-группу у  $\beta$ -углеродного атома боковой цепи. Ингибиторами необратимой реакции, осуществляемой альдегиддегидрогеназой, являются хлоргидрат, тетурам, анаприлин и ацетальдегид. Альдегидредуктаза локализована в основном в цитозоле. Относительная молекулярная масса изофермента для мозга крыс и человека составляет  $40 \cdot 10^3$ . Фермент обладает сродством к альдегидам, образованным из норадреналина, октопамина и норметадреналина. Ингибиторами необратимой реакции, осуществляемой

альдегидредуктазой, являются барбитураты, фенотиазины, дифенилгидантоин, 5-оксииндолуксусная кислота. Спирты образуют конъюгаты с серной кислотой. Окисление катехоламинов в синапсосомах может контролироваться супероксидистимутазой (Thomas et al., 1976).

Исследование количественных соотношений биогенных спиртов и кислот и их метоксипроизводных в моче и плазме крови является важным диагностическим тестом патологии обмена катехоламинов и функционирования моноаминергических нейронов.

Биологическая активность продуктов обмена биогенных аминов. Продукты обмена биогенных аминов как основного (см. схему 6), так и «побочного» пути (см. схему 7—9) обладают биологической активностью. Так, образование из дофамина морфинподобных алкалоидов имеет важное значение в генезе наркомании, алкоголизма (И. А. Сытинский, 1976) и болезни Паркинсона. Биогенные альдегиды способны связываться с белками мозга, угнетать обмен глюкозы (пентозный цикл), окислительные ферменты митохондрий, глутаматдекарбоксилазу. Продукты O-метилирования катехоламинов являются слабыми симпатомиметиками, они замещают норадреналин и дофамин в цитоплазме терминалей и выступают в качестве ложных медиаторов, возбуждая  $\alpha$ -адренорецепторы; способствуют проникновению биогенных аминов через гематоэнцефалический барьер; стимулируют высокоаффинную и ингибируют низкоаффинную систему захвата норадреналина терминалями.

**Катехоламин-O-метилтрансфераза (КОМТ).** Фермент открыт в 1959 г. (Guldberg, Magsden, 1975). Функциональная роль КОМТ состоит в инактивации свободных катехоламинов в эффекторных клетках (в постсинаптическом нейроне), особенно периферической нервной системы. КОМТ катализирует O-метилирование катехоламинов:



ОН-группа субстрата связывается с SH-группой фермента при участии  $\text{Mg}^{++}$  или  $\text{Mn}^{++}$ . Субстратами КОМТ являются норадреналин, адреналин, ДОФА, 3,4-диоксифенилуксусная кислота, N-ацетилсеротонин, октопамин, фентоламин и тирамин. Субстратами КОМТ являются и продукты дезаминирования биогенных аминов (см. схемы 6—8). Наиболее эффективные

субстраты — это биогенные амины, содержащиеся в бензольном кольце две смежные ОН-группы, при этом при наличии ОН-группы в 4-м положении О-метилированию подвергается ОН-группа в 3-м положении. Амины без ОН-группы (например, фенамин, эфедрин) не метилируются КОМТ. Амины с одной ОН-группой в 3-м положении (метараминол, мезатон) также не метилируются, однако метилирование происходит при наличии ОН-группы в 4-м положении (тирамин). Метилирования сразу двух ОН-групп биогенных аминов не происходит. О-метилирование дофамина в пара-положении в экстрапирамидной системе мозга может служить причиной кататонии.

О-метилированные производные катехоламинов обладают в 100 раз меньшей биологической активностью, чем катехоламины. Кофактором КОМТ являются  $Mg^{++}$  (0,2—2,0 мМ), однако высокие их концентрации тормозят активность фермента. При повышении концентрации  $Ca^{++}$  в инкубационной среде торможение  $Mg^{++}$  исчезает. Эндогенным регулятором активности КОМТ является S-аденозилгомоцистеин, который может ингибировать фермент.

Для КОМТ нет ярко выраженной специфичности в региональном распределении в мозге. Отсутствует также корреляция в региональном распределении норадреналина, дофамина, тирозингидроксилазы и КОМТ. Наиболее высокой активностью КОМТ в мозге обезьян обладают нейрогипофиз, полосатое тело, морской конек, подбугорная область и хвостатое ядро. Глиальные клетки обладают как активностью MAO, так и некоторой активностью КОМТ.

КОМТ является растворимым цитозольным ферментом, хотя некоторая часть его может быть связана с мембранами. В синапсосомах определяется 60% активности КОМТ гомогената мозга крыс, причем эта активность высвобождается при осмотическом шоке. КОМТ определяется в цитозольной фракции клеток и в цитоплазме синапсосом подбугорной области мозга крыс (Wloch, Foppit, 1972). Существенной активности КОМТ во фракциях СП, синаптических мембран и митохондрий при этом не обнаружено. По-видимому, инактивации катехоламинов в синаптической щели не происходит, так как КОМТ является внутриклеточным ферментом и не локализуется на внешней стороне пост-СМ. В плазме крови КОМТ отсутствует.

Локализованная в нервной ткани КОМТ еще мало изучена. Растворимая КОМТ (оптимум рН 7,5—8,2) печени имеет низкую отн. мол. м. —  $24 \cdot 10^3$ . В мозге также отмечено 2 изофермента КОМТ (Axelrod, Vessel, 1970). Для синапсосом растворимая КОМТ практически не отличается по кинетическим свойствам от мембранно-связанной формы. Контроль за синтезом КОМТ осуществляют глюкокортикоиды. Снижение активности КОМТ наблюдается при атрофии, денервации симпатических нервов, что свидетельствует, во-первых, как о внутри-, так и о

экстранейрональной локализации фермента, во-вторых, о возможности пресинаптической регуляции активности постсинаптической КОМТ. При введении резерпина или  $\alpha$ -СН<sub>3</sub>-паратирозина — факторов, снижающих запасы норадреналина в терминалях, активность КОМТ уменьшается в периферических тканях. По данным Вгоsh (1974), в солевых железах крыс внутри- и экстранейрональные КОМТ представляют собой различные изоферменты. Для симпатической нервной системы нет прямой зависимости между уровнями активности КОМТ и свободного норадреналина. Существует обратная связь между степенью торможения КОМТ и степенью нейронального захвата катехоламинов. Как правило, вещества, которые ингибируют нейрональный захват, не увеличивают содержания О-метилированных метаболитов. Торможение экстранейронального захвата катехоламинов приводит к уменьшению образования О-метилированных производных в эффекторных клетках. В мозге О-метилирование следует за окислительным дезаминированием под действием МАО. Ингибиторы МАО в мозге способствуют значительному образованию О-метилированных продуктов. Увеличение содержания в мозге этих продуктов обмена вызывается также адренолитическими средствами — нейролептиками (хлорпромазин, амфетамин). Ингибиторы КОМТ, как и МАО, мало влияют на продолжительность действия введенных *in vivo* пирокатехинаминов и на длительность и силу эффектов, вызванных раздражением адренергических нервов. Таким образом, инактивация катехоламинов при помощи МАО и КОМТ как в пост-, так и в пресинаптическом нейроне происходит после захвата клетками свободных «отработанных» катехоламинов из синаптической щели (рис. 25).

Ингибиторами КОМТ являются многие вещества: неконкурентные ингибиторы — пирогаллол и галловая кислота; конкурентные ингибиторы — производные катехолов (изопреналин, апоморфин, тетрагидропапаверин, L-ДОФА, дофацетамид), группа флавоноидов (рутин, кверцетин) и пиридоксаль-5-фосфат; неконкурентные ингибиторы группы трополонов; неконкурентные ингибиторы типа 8-оксихинолина. Способностью ингибировать КОМТ обладают также аскорбат и пара-хлормеркурибензоат, что указывает на наличие SH-группы в активном центре фермента.

**Фенолсульфотрансфераза.** Биогенные амины мозга и других тканей, как и некоторые продукты их обмена, конъюгируют с образованием сульфатов и глюкуронидов. Фенолсульфотрансфераза, катализирующая этот процесс, обнаружена в подбугорной области, морском коньке, среднем мозге и полосатом теле. Наиболее активен этот фермент в отношении дофамина и продуктов его обмена. В синапсосомах фермент обнаружен в цитоплазме.

**Фенилэтанол-N-метилтрансфераза.** Этот фермент, открытый в 1957 г., участвует в N-метилировании норадреналина. Дона-

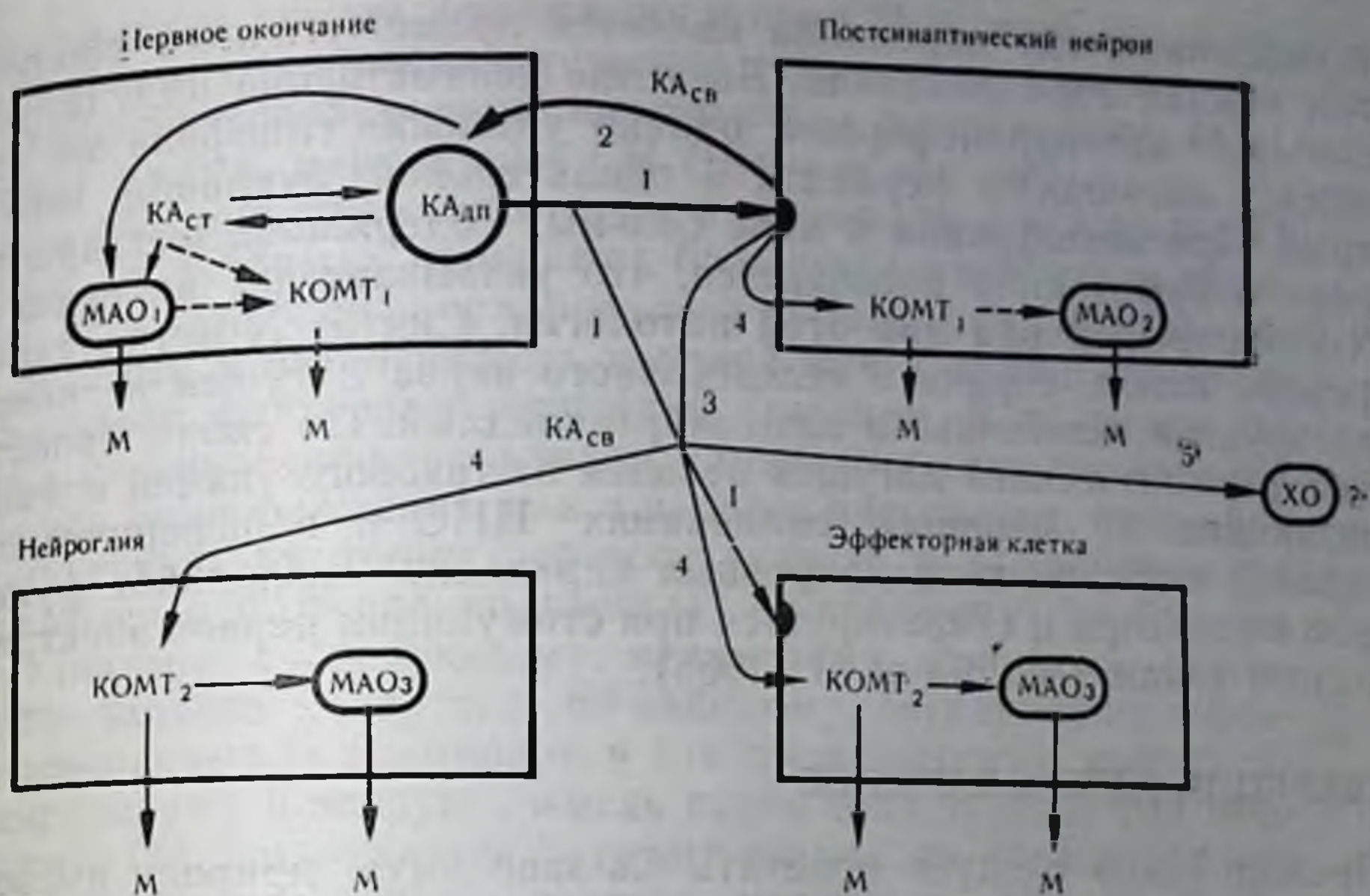


Рис. 25. Схематическое изображение инактивации катехоламинов.

КА — катехоламины; М — соответствующие метаболиты; КА<sub>дп</sub>, КА<sub>ст</sub> и КА<sub>св</sub> — депонированные в везикулах, свободные в терминалях (варикозах) и свободные внеклеточные КА, MAO<sub>1,2,3</sub> и КОМТ<sub>1,2</sub> — изоферменты. Сплошные линии — главный путь, прерывистые — вероятный путь обмена; 1 — секреция; 2 — высокоизбирательный нейрональный захват КА; 3 — циркуляция; 4 — экстранейрональный захват КА (захват-2); 5 — хиноидное окисление.

тором СH<sub>3</sub>-групп являются S-аденозилметионин и в некоторых случаях 5-метилтетрагидрофолиевая кислота. Субстратами этого фермента служат дофамин, серотонин, норметадреналин и октопамин (см. схему 6—8). Субстраты N-метилирования — это первичные и вторичные фенилэтанолламины, первичные фенилэталламины. Лучшими субстратами являются те биогенные амины, в боковой цепи которых имеется β-ОН-группа. Степень N-метилирования регулируется субстратным торможением.

N-метилтрансфераза является растворимым цитозольным ферментом, однако 15—20% ее связано с мембранами. Фермент образует тетрамер с отн. мол. м.  $160 \cdot 10^3$  (Goldstein et al., 1972). В состав фермента входит 8 SH-групп, большое количество глутаминовой и аспарагиновой кислот, а также их аминов. По-видимому N-метилтрансфераза — это сложный белок, который содержит гексозамин. Норадреналин и S-аденозилметионин связываются с различными активными центрами фермента. S-аденозилгомоцистеин ингибирует связывание S-аденозилметионина с ферментом, а адреналин — связывание норадреналина с его активным центром.

В 1964 г. N-метилтрансфераза была обнаружена в мозге. В мозге млекопитающих фермент локализуется в обонятельной луковице, подбугорной области. Содержание адреналина в мозге млекопитающих составляет 5—15% от общего количества ка-

техоламинов, где адреналин является промежуточным продуктом обмена норадреналина. Введение декаметазона индуцирует синтез N-метилтрансферазы, однако удаление гипофиза не изменяет активности фермента в обонятельной луковице мозга крыс. При шизофрении в моче больных содержание метадреналина и буфотенина повышается, что указывает на активацию N-метилтрансфераз при этой патологии. Синтез N-метилтрансферазы мозга, сердца и селезеночного нерва лягушек не контролируется экзогенными глюкокортикоидами. По своим свойствам фермент тканей лягушек отличается от такового тканей млекопитающих. В нервных окончаниях ЦНС и периферической нервной системы холоднокровных адреналин выполняет функцию медиатора и секретируется при стимуляции нервов электрическим током (Azuma et al., 1965).

### СЕКРЕЦИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ

Прежде всего следует отметить Са-зависимую природу высвобождения эндогенных или экзогенных (меченых) катехоламинов из адренергических нервных окончаний симпатических нервов, срезов или синапсом мозга, а также из клеток мозгового слоя надпочечников при деполяризующих воздействиях (О. М. Авакян, 1976; Rubin, 1970). Например, калиевая деполяризация или стимуляция электрическим током синапсом соответствующих отделов мозга приводит к Са-зависимой секреции дофамина или норадреналина (В. И. Родина и др., 1977; de Bellegoche et al., 1976). Са-ионофор А 23187 стимулирует секрецию эндогенного или экзогенного дофамина синапсомами полосатого тела мозга крыс (Holz, 1975). В ходе деполяризации усиливается поступление Са<sup>++</sup> в адренергические терминалы, вследствие чего инициируется секреция катехоламинов. Вход Са<sup>++</sup> в клетки при деполяризации блокируется избытком Mg<sup>++</sup>, а также Mn<sup>++</sup> в инкубационной среде, в некоторых случаях — тетродотоксином (Blaustein et al., 1972). При калиевой деполяризации синапсом мозга мышей интенсивность секреции норадреналина находится в линейной зависимости от  $\log [K^+]_o$ ; при действии Са-ионофора А 23187 интенсивность секреции норадреналина (и ГАМК) зависит линейно от  $\log [Ca^{++}]_o$  (Cotman et al., 1976).

По-видимому, норадреналин высвобождается посредством экзоцитоза (см. главу 7). Доказательствами этого служат следующие факты: Са-зависимая секреция норадреналина и его везикулярных спутников в ответ на возбуждение терминалей; Са-зависимая секреция ложных медиаторов при стимуляции нервов, если они были накоплены в СП, а не в цитозоле нервных окончаний (Smith, 1973); обнаружение спонтанных миниатюрных потенциалов пост-СМ гладких мышц, иннервируемых адренергическими нервами (Stjarne, 1970); обнаружение СП

адренергических нервов, прилипших к пре-СМ и открытых в синаптическую щель; пресинаптическая стимуляция адренергических периферических нервов, вызывающая просветление (опустошение) малых гранулярных СП (Bisby et al., 1971).

Вновь поступившие с аксотоком в терминали «молодые» СП в отличие от «старых» проявляют большую активность в депонировании и секреции норадреналина (Haggendal, Dahlström, 1972). Частота и интенсивность нервной импульсации являются естественными факторами регуляции секреции. В условиях насыщения меченым норадреналином адренергических терминалей спонтанное высвобождение, как и процесс насыщения, имеет две характеристики: быстрому процессу захвата и высвобождения подвергаются небольшие количества, по-видимому, свободного пула медиатора; последующему, медленному, процессу — основная часть запасов медиатора, по-видимому, везикулярного фонда. Адренергические терминали в ответ на короткую импульсацию секретируют в первую очередь вновь синтезированный норадреналин. Об этом свидетельствуют опыты по использованию меченых предшественников синтеза медиатора (Kopin et al., 1968).

Большую роль в регуляции секреции норадреналина Haggendal (1970) приписывает функционированию Na, K-насоса, причем «отключение» этого насоса при деполяризации терминалей останавливает систему активного захвата медиатора из среды и облегчает его секрецию (см. главу 7). Предполагается, что и сам медиатор в синаптической щели может дополнительно контролировать Na, K-АТФ-азу пре-СМ: большие концентрации норадреналина тормозят мембранный насос, малые — активизируют его (Р. Н. Глебов, Н. М. Дмитриева, 1974; Gilbert et al., 1975). Регуляция секреции норадреналина биологически активными веществами (цАМФ, ангиотензин, простагландины) и медиаторами (ацетилхолин и сам норадреналин) подробно рассмотрена в главах 7, 9, 14.

## ОБРАТНЫЙ ЗАХВАТ КАТЕХОЛАМИНОВ

Около 80% отработанного норадреналина (или дофамина) инактивируется в синаптической щели при помощи системы обратного захвата терминалями. Остальные 20% медиаторов устраняются либо посредством диффузии во внеклеточное пространство, либо путем захвата эффекторными клетками. Эта система, универсальная для всех медиаторов, наиболее изучена для катехоламинов при использовании гистохимических и биохимических методов с меченым норадреналином (или дофамином) на моделях: периферические адренергические нервы, срезы мозга или сердца, синаптосомы определенных структур головного мозга (Iversen, 1974). Наиболее удобным объектом изучения захвата являются синаптосомы тех отделов головного мозга, в

## Характеристика обратного захвата норадреналина

Показатель	Захват-1	Захват-2
Оптимальная концентрация норадреналина	$10^{-5}$ — $10^{-8}$ М	$10^{-2}$ — $10^{-4}$ М
Сродство переносчика к норадреналину	Высокое ( $K_m = 2$ — $4 \cdot 10^{-7}$ М)	Низкое ( $K_m = 2,5 \cdot 10^{-4}$ М)
Характер переноса норадреналина	Протекает с насыщением против градиента концентрации	Протекает без насыщения, в линейной зависимости от градиента концентрации
Каким мембранам свойственна транспортная система	Исключительно пре-СМ адренергических терминалей	Для любых нейрональных и других мембран
Превращения захваченного катехоламина	Поступает в основном в СП	Быстро подвергается распаду или пополняет свободный фонд норадреналина в адренергических терминалях
Субстраты переноса	Норадреналин и дофамин (в гош-форме), а также некоторые $\beta$ -фенилэтиламины (ложные медиаторы). Норадреналин > адреналин > изадрин	Многие биогенные амины. Изадрин > адреналин > норадреналин
Необходимость ионной среды инкубации	Высокое отношение Na/K; аллостерическая зависимость от $[Na^+]_o$ ; дефицит $[Na^+]_o$ или $[K^+] = 0$ снижают захват-1	Отсутствие или слабая зависимость от $[Na^+]_o$
Высвобождение норадреналина (без деполяризации) после смены ионной среды с медиатором на ионную среду без него	Отсутствие эффекта или небольшое высвобождение	Быстрое высвобождение
Оптimum температуры и pH	pH 7,4, 37 °C	Слабая зависимость от температуры
Отношение к метаболитическим ядам (ДНФ, моноиодацетат, цианиды, тиоловые реагенты и т. д.)	Торможение	Отсутствие эффекта или слабое торможение
Действие уабаина (0,1—1,0 мМ)	Значительное и полное торможение; зависимость от Na, K-АТФ-азы	Отсутствие эффекта или слабое торможение
Стереоспецифичность переноса	L-норадреналин > D-норадреналин	Отсутствие стереоспецифичности



Показатель	Захват-1	Захват-2
Калневая деполяризация или стимуляция электрическим током	Торможение (Haggendal, 1970; Bogdansky et al., 1970)	Не влияет или активирует
Специфические ингибиторы	Кокаин, трициклические антидепрессанты: имипрамин, дезимипрамин ( $K_1 = 0,02$ мкМ) Некоторые $\alpha$ -адренолитики	Нечувствительны к антидепрессантам  Торможение О-метилированными катехоламинами и морфином
Эффективность при синаптической передаче	В нормальных физиологических условиях основной способ инактивации норадреналина	Может играть роль в инактивации при чрезмерной пресинаптической стимуляции
Изменения в онтогенезе	Скорость ( $K_m$ не изменяется) становится максимальной при созревании синапсов	Не изменяется

которых содержатся наибольшие количества норадреналина или дофамина. Следует учитывать, что глиальные клетки также способны захватывать катехоламины. Системы транспорта норадреналина во всех случаях оказались практически одинаковыми. Существует две системы обратного захвата катехоламинов (см. табл. 15): 1) высокоизбирательная активная система транспорта катехоламинов через пре-СМ адренергических терминалей против градиента концентрации с низким значением  $K_m$  (захват-1, нейрональный захват); 2) низкоизбирательная пассивная система транспорта через любые нейрональные и другие клеточные мембраны с высоким значением  $K_m$  (захват-2, экстранейрональный захват). Физиологической значимостью в инактивации норадреналина или дофамина в синаптической щели обладает система захват-1, зависящая от функционирования Na, K-насоса. Предполагается, что антигенная группа хромомембрина В может входить в состав переносчика (Winkler, Horstnagl, 1973). Работа гипотического переносчика, по-видимому, связана с функционированием Na, K-насоса. По данным некоторых авторов (Logan, Waters, 1976), наличие  $Ca^{++}$  и АТФ в инкубационной среде повышает скорость захвата-1 для норадреналина. В связи с этим предполагается, что медиатор активно переносится в виде комплекса норадреналин —  $Ca^{++}$  — АТФ. Обработка синапсом фосфолипазой А, трипсином и детергентами значительно снижает интенсивность захвата-1 норадреналина (Sun, 1974). Убаин блокирует захват-1 синапсоматами

норадреналина в большей степени, чем повышает (как деполаризующий агент) его секрецию (Bogdansky, Brodie, 1969). Избирательность переноса к катехоламинам определяется типом естественного медиатора в данном нервном окончании. Например, дофаминсодержащие синапсомы гораздо эффективнее захватывают дофамин, чем норадреналин. Наоборот, норадреналинсодержащие синапсомы мозга теплокровных эффективнее захватывают норадреналин, чем дофамин. Срезы сердца лягушек эффективнее захватывают адреналин, чем норадреналин. Хотя активный транспорт норадреналина через пре-СМ и связывание его в СП различны, существует тесная зависимость между этими процессами (Р. А. Альтшулер, В. Г. Граник, 1976). Самонасыщающийся процесс захвата-1 можно представить себе как постепенное заполнение норадреналином «свободных мест» в СП. По-видимому, существует обратная зависимость между количеством синтезируемого в терминали норадреналина и количеством его, которое может захватываться из синаптической щели. Торможение тирозингидроксилазы заметно увеличивает в опытах *in vivo* скорость захвата-1 норадреналина. Учитывая, что после истощения адренергических СП при помощи резерпина скорость захвата-1 обоих стереоизомеров норадреналина становится одинаковой, можно полагать, что именно депонирование (а не перенос через пре-СМ) является процессом, зависимым от пространственной конфигурации молекулы медиатора. Действительно, СП способны накапливать только L-норадреналин (Euler, Lishaiko, 1964). Из изложенного следует, что можно блокировать захват-1 в условиях предотвращения возможности депонирования норадреналина внутри СП (например, при действии D-амфетамина, резерпина *in vivo*). В этом случае в понятие «захват-1» следует включать суммарный процесс активного переноса норадреналина через пре-СМ, везикулярный захват и депонирование в везикулах. В отличие от резерпина  $\alpha$ -амфетамин (фенамин), блокируя везикулярный захват, не истощает везикулы, а вызывает высвобождение норадреналина в синаптическую щель, по-видимому, из свободного фонда.

Пока не ясно, почему некоторые митотические яды (колхицин, винбластин) блокируют активный захват норадреналина и серотонина синапсомами (Nomiya, Segawa, 1975).

Следует отметить, что блокаторы активного переноса норадреналина через пре-СМ вызывают потенциацию постсинаптических эффектов медиатора.

## АДРЕНОРЕЦЕПТОРЫ

Эти рецепторы локализованы на внешней поверхности эффекторных клеток. Во внеклеточной среде катехоламины практически не разрушаются, поэтому их действие как тканевых гормо-

нов может распространяться на большие расстояния. Различают два основных типа адренорецепторов, каждый из которых связан как с возбуждением, так и с торможением (табл. 16). По

Таблица 16

Свойства  $\alpha$ - и  $\beta$ -адренорецепторов  
(С. В. Аничков, 1974; Ahlquist, 1948, 1966)

Свойства	$\alpha$ -Адренорецептор	$\beta$ -Адренорецептор
Миметики	Дофамин, адреналин (в больших дозах), октопамин, метараминол, пара-окси-эфедрин, мезатон	Изадрин, адреналин (в малых дозах), алуцент
Антагонисты	Дигидроэрготамин, фентоламин, дибензамин, феноксифензамин, дибензиллин, пипероксан	Производные фенилэтанолламина: дихлоризопротеренол, анаприлин, неталид (пронеталол)
Локализация	Гладкие мышцы желудочно-кишечного тракта (Т), севявыносящие протоки (В), матка (В), сетчатое образование среднего мозга (Т), селезенка (В)	Сердце (В), гладкие мышцы сосудов матки (Т), скелетные мышцы (Т), сетчатое образование среднего мозга (В)
Наиболее важные связи между норадреналином и рецептором	Для реакции важно достаточно близкое расстояние между катионной «головкой» норадреналина и анионным центром рецептора	Для реакции важно наличие двух смежных ОН-групп в ароматическом кольце норадреналина
Возможная идентичность активного центра рецептора и фермента	Mg-АТФ-аза (?) или регуляторная субъединица АДЦ-азы (Bloom, Goldman, 1966; Chasin et al., 1972)	Регуляторная субъединица АДЦ-азы внешней стороны пост-СМ (Robison et al., 1971)

Примечание. В — возбуждение, Т — торможение. В печени, бурой жировой ткани встречаются смешанные  $\gamma$ -адренорецепторы, регулирующие уровень гликолиза и липолиза в тканях.

своей структуре дофаминорецепторы (табл. 17) отличаются от норадреналиновых, т. е. адренорецепторов. Так, многие  $\beta$ -адренорецепторы подавляют стимуляцию АДЦ-азы норадреналином, но не дофамином (von Hungen, Roberts, 1973). По-видимому, стимулируемые этими медиаторами АДЦ-азы нейрональных мембран различаются по своим свойствам. Общим для рецепторов катехоламинов является то, что регуляторная субъединица АДЦ-азы наружной поверхности пост-СМ может входить в активный центр рецепторов или индуцироваться в ходе взаимодействия норадреналина или дофамина с рецептором (Robison et al., 1971; Iversen, 1975). Соответствующие агонисты норадреналина и дофамина также активируют АДЦ-азу, а антагонисты

Характеристика двух типов дофаминергических нейронов мозга животных  
(Cools, Von Rossum, 1976, с изменениями)

Свойства	Возбуждающий медиатор	Тормозящий медиатор
Топография	Окончания передней и средней зон хвостатого ядра кошек, новая зона полосатого тела мозга крыс	Остальная область хвостатого ядра кошек. Добавочное ядро у крыс
Количество нейронов	Небольшое	Большое
Содержание дофамина в нейронах по данным гисто-флюоресцентного метода	Преимущественно диффузная зеленая флюоресценция	Преимущественно точечная зеленая флюоресценция
Появление в онтогенезе	Медленное постнатальное образование синапсов	Быстрое созревание синапсов
Уровень обмена веществ	Высокий уровень обмена дофамина, синтез дофамина избирательно блокируется $\alpha$ -метил-пара-тирозином (Н 44/68); отсутствие чувствительности к резерпину (?)	Низкий уровень обмена дофамина. Отсутствие чувствительности синтеза дофамина к препарату Н 44/68. Опустошение резерпином СП от медиатора (?)
Постсинаптическое действие	Возбуждение; образование ВПСП	Торможение; образование ТПСП
Локализация дофаминорецепторов	Пресинаптическое возбуждение; модуляция секреции ГАМК	Постсинаптическое торможение
Идентичность дофаминорецептора с ферментом	Регуляторная субъединица АДЦ-азы	(?)
Миметики	L-ДОФА, амфетамин, апоморфин, пририбедил	L-ДОФА, амфетамин
Антагонисты	Галоперидол, некоторые бутирофеноны, $\alpha$ -флупентихол	Эргометрин; L-(2-пириимидил)-4-пиперонил-пиперазин
Действие 6-оксидофамина, вызывающего дегенерацию дофаминергических аксонов	Активизация дофаминорецепторов	Торможение дофаминорецепторов
Клиническая картина паркинсонизма	Торможение синтеза дофамина	Преобладание функционирования данного типа нейронов

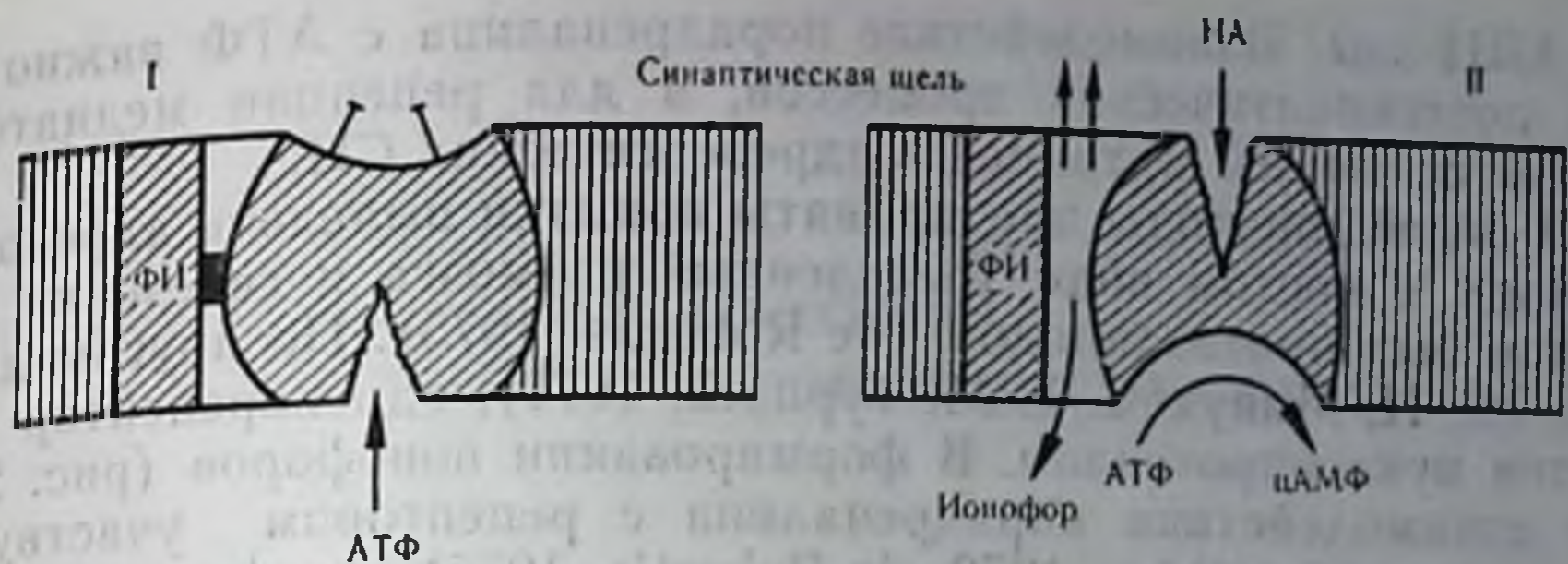


Рис. 26. Действие адренорецептора и образование ионофор (по Smythies, 1972, с изменениями).

I — покой; II — возбуждение; НА — норадреналин; ФИ — фосфатидилинозитид.

снимают эффект медиаторов как в отношении активации фермента, так и в отношении повышения уровня цАМФ (см. главу 9). Для адренорецепторов, как и для холинорецепторов, характерно явление десенситизации. Денервация симпатических нервов может увеличивать чувствительность адренорецепторов пост-СМ к катехоламинам (Б. Н. Манухин, 1968).

Адренорецептор реагирует с тремя функционально-активными группами L-норадреналина: диоксифенильной,  $\text{NH}_2$ -группой и  $\beta$ -ОН-группой. Медиатор взаимодействует с адренорецептором с определенной стереоконформацией. Анионный центр рецептора электростатически взаимодействует с катионной «головкой»  $\text{NH}_2$ -группы молекулы норадреналина;  $\beta$ -ОН-группа медиатора образует, по-видимому, водородные связи с рецептором, а смежные ОН-группы ароматического кольца молекулы норадреналина образуют с рецептором либо водородные связи, либо хелатную связь с  $\text{Fe}^{++}$  молекулы рецептора. Адренорецептор является белком (Б. Н. Манухин, 1968; Н. В. Комиссаров, 1969). В состав активного центра адренорецепторов входят SH-группа и, возможно, карбонильная имидазольная группа гистидина. Снижение величины рН с 7,4 до 6,8 уменьшает реактивность адренорецепторов. Как правило, во многих органах с симпатической иннервацией одна молекула адренорецептора реагирует с одной молекулой норадреналина или адреналина. Обнаруженная отрицательная кооперативность во взаимодействии с адренорецептором обеспечивает высокую чувствительность клеток-мишеней к низким концентрациям катехоламинов (Limbird et al., 1975). Реакция катехоламинов с  $\alpha$ -адренорецептором гладких мышц, полностью деполяризованных КСl, все же вызывает сокращение мышц (Schild, 1960).

Предложена модель адренорецептора, в активный центр которого входит АТФ, причем конечная реакция приводит к увеличению синтеза цАМФ (Belleau, 1965). Эта модель оказалась не совсем точной. Как мы уже указывали, в роли рецептора может выступать не каталитическая, а регуляторная субъединица

ца АДЦ-азы. Взаимодействие норадреналина с АТФ важно не для постсинаптических процессов, а для рецепции медиатора соответствующей матрицей в адренергических СП.

В последние годы предприняты попытки выделить адренорецепторы в чистом виде. Выделенный из мозга и селезенки рецептор был протеолипидом (de Robertis, 1975). По другим данным (Б. Н. Манухин, Т. М. Турпаев, 1971), адренорецептор является нуклеопротеидом. В формировании ионофоров (рис. 26) при взаимодействии норадреналина с рецептором участвуют инозитиды (Smythies, 1972; de Robertis, 1975), фосфатные группы которых могут иметь значение для формирования анионного центра- $\alpha$ -адренорецепторов (Belleau, 1967). Очищенный  $\beta$ -адренорецептор является тетрамерным белком (отн. мол. м.  $16 \cdot 10^4$ ), имеющим свободные SH-группы (Lefkowitz, Haber, 1973). Относительная молекулярная масса субъединиц дофаминорецепторов мозга равна  $6 \cdot 10^4$  (Lowneue et al., 1974).

## 12. Биохимия серотонинергических синапсов

---

### РЕГИОНАЛЬНАЯ И СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ СЕРОТОНИНА В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ

Серотонин, или 5-окситриптамиин, открыт в 1947 г. Название связано с его первоначальным выделением из сыворотки крови и сократительным действием на гладкие мышцы. Серотонин определяют биологическим (по реакции сокращения гладких мышц), флюорометрическим (по реакции с НСІ под влиянием ультрафиолетовых лучей) и гистохимическим (в сочетании с люминесценцией веществ при использовании формальдегида) методами. Люминесцентный метод, предложенный в 1962 г. Falck, Hillarp, позволяет дифференцировать катехоламинергические волокна от желтого типа свечения и серотонинергические волокна от зеленого. Наиболее высокое содержание серотонина обнаружено в хромаффинных гранулах клеток желудочно-кишечного тракта, селезенки, в лаброцитах кожи, тромбоцитах, где этот биогенный амин выполняет гормональную функцию, и в тканях головного и спинного мозга позвоночных животных, где серотонин, по-видимому, способен выполнять функцию медиатора.

В мозге серотонин распределен неравномерно (см. рис. 24, табл. 13). Основная часть серотонинергических нейронов расположена в срединной области

ствола головного мозга животных, особенно в дорсальном и медиальном ядрах шва продолговатого, среднего мозга и моста, в подбугорной области. Серотонинергические нейроны иннервируют большие области ЦНС, включающие новую кору, морской конек, миндалевидное тело, бледный шар, подбугорную область, ствол головного мозга и спинной мозг; в спинном, промежуточном и переднем мозге животных серотонинергические нейроны не обнаружены. Распределение серотонина во многом совпадает с распределением в мозге норадреналина, однако в отличие от последнего значительное количество серотонина обнаруживается в структурах лимбической системы.

Серотонинергические нейроны преобладают в медиальной части ствола, катехоламинергические — в латеральных его структурах. Серотонин локализован также в периферической нервной системе (блуждающий, седалищный, бедренный и другие нервы).

Увеличить концентрацию серотонина в мозге можно введением ингибиторов МАО, предшественника — 5-окситриптофана или их комплексным введением. В последнем случае наблюдаются симптомы, свидетельствующие о нарушении регуляторных механизмов конвергенции синапсов (чрезвычайное возбуждение, нарушение координации, утрата рефлексов, тремор и т. д.).

Исследование содержания серотонина в различных субклеточных фракциях тканей мозга показывает, что этот амин, как и катехоламины, находится преимущественно в связанной форме. Отношение связанного серотонина мозга к свободному составляет в среднем 2,5. Около 20—25% свободного серотонина в стволе, подбугорной области и хвостатом ядре определяется в цитозоле, остальные 75—80% приходятся в основном на синаптосомы и частично на микросомы (Levi, Maupert, 1964). При фракционировании целого мозга серотонин в большей степени, чем при фракционировании подбугорной области, попадает во фракцию микросом, что объясняется не его исходной локализацией в этих органеллах, а связыванием серотонина, высвободившегося при гомогенизации клеток.

В нервных окончаниях часть серотонина находится в свободной, легко обмениваемой форме, поддерживаемой как синтезом, так и обратным захватом; большая его часть существует в СП в связанной форме. Существование серотонина в СП предохраняет его от действия МАО и других ферментов. Подобный механизм депонирования серотонина, как и других медиаторов, объясняет постоянство его содержания в нервной ткани.

Первые данные о выделении изолированных СП из мозга животных биохимическими методами указывали (Roberts, 1967) на то, что СП могут быть местом хранения серотонина, однако его содержание в СП по сравнению с количеством в синаптосомах составляло 20—25%, т. е. было недостаточно высоким. Этот

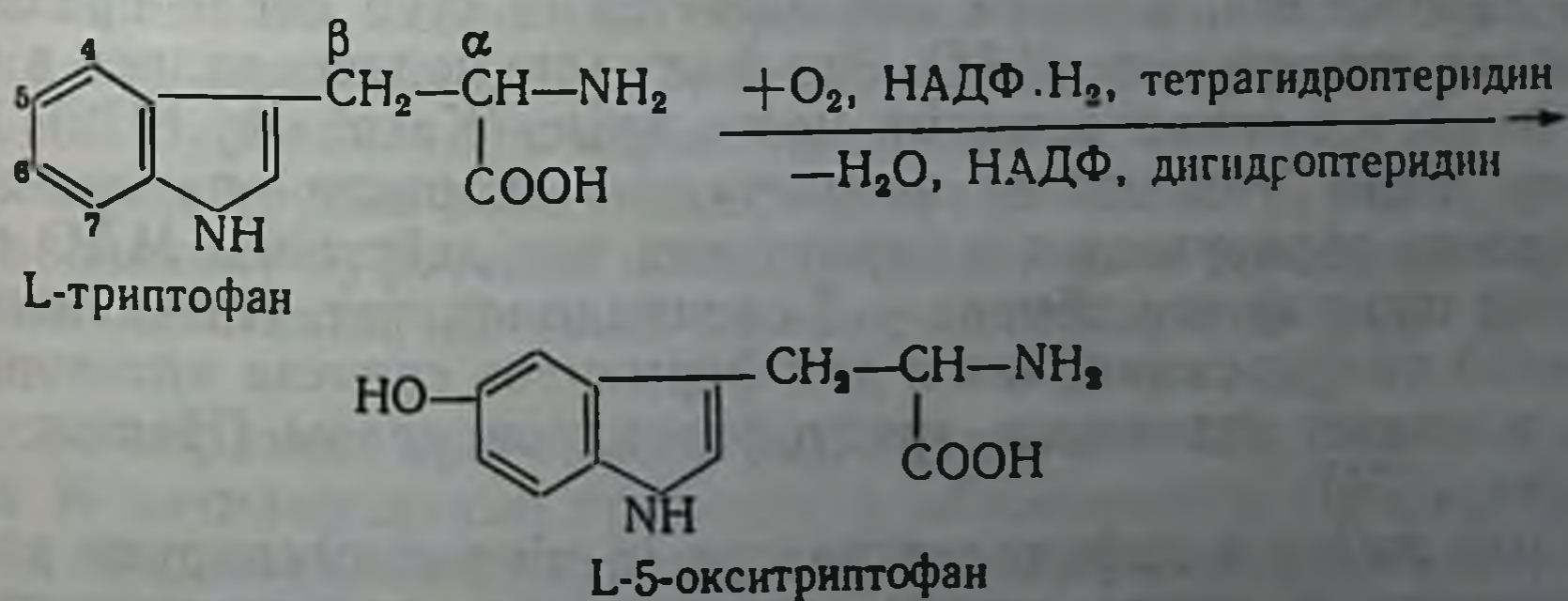


факт объясняется тем, что при выделении СП часть серотонина из них может высвобождаться в среду. Гистохимически показано, что серотонин локализуется в мозге частично в теле нейронов и в большей степени в нервных окончаниях, причем в последних главным образом в гранулярных СП (Dahlström, Fuxe, 1964; Segawa et al., 1970).

## БИОСИНТЕЗ СЕРОТОНИНА

Предшественником серотонина является триптофан (Udenfriend, 1956). Промежуточного продукта биосинтеза (5-окситриптофан) в мозге очень мало, так как он быстро превращается в серотонин. Синтез и распад серотонина в мозге протекают довольно быстро ( $\tau_{50} = 10-30$  мин). Серотонин плохо проникает через гематоэнцефалический барьер, однако окситриптофан достаточно легко проходит через него. Лимитирующей стадией синтеза серотонина, протекающего в основном в нервных окончаниях серотонинергических нейронов, является реакция образования 5-окситриптофана.

**Триптофан-5-гидроксилаза.** Этот фермент обнаружен в ЦНС млекопитающих в 1963 г. Максимальная активность триптофан-5-гидроксилазы наблюдается в подбугорной области, эпифизе (шишковидное тело), среднем и продолговатом мозге, стволе, т. е. в тех областях мозга, где локализован и серотонин. Гидроксилирование триптофана в головном мозге установлено *in vivo* при внутримозговом введении меченого триптофана (Gal, Marshall, 1964). Уровень синтеза серотонина зависит в значительной мере от поступления триптофана в мозг через гематоэнцефалический барьер. Фермент из слизистой оболочки кишечника требует присутствия в инкубационной среде  $\text{Cu}^{++}$ , аскорбата и НАДФ. $\text{H}_2$ . Реакция протекает в аэробных условиях и активируется кислородом. В мозге этот фермент требует наличия тетрагидроптеридинового кофактора и НАДФ. $\text{H}_2$  (Graham-Smith, 1967):



Конкурентными ингибиторами фермента являются параклорфенилаланин, фенилаланин, дофамин, 6-хлортриптофан,

ДОФА и адреналин. Наиболее специфичный ингибитор — параклорфенилаланин — снижает содержание серотонина в мозге в большей степени, чем катехоламинов. Лишь большие концентрации ( $K_i = 500-600$  мкМ) тирозина тормозят гидроксилирование триптофана и фенилаланина. Синтез серотонина из меченого  $^3\text{H}$ -триптофана в синапсосомах ствола мозга крыс угнетают ДОФА и частично норадреналин и дофамин (Kagobath et al., 1972).

Триптофан-5-гидроксилаза мозга является тетрамером (отн. мол. м.  $23 \cdot 10^4$ ), состоящим из двух субъединиц с близкой отн. мол. м.  $575 \cdot 10^2$  и  $609 \cdot 10^2$  (Youdim et al., 1975). Изоэлектрическая точка фермента находится в области рН 5,2—5,7. В состав активного центра фермента эпифиза быка входит SH-группа (Hogi, 1975). По-видимому, гидроксилирование фенилаланина и триптофана катализирует один и тот же фермент. Локализована триптофан-5-гидроксилаза в микросомах и цитозоле. Более тщательное фракционирование тканей мозга позволило установить высокую активность фермента в синапсосомах (Kuhag et al., 1972). Значение  $K_m$  для триптофана равно 0,4 мМ для растворимого фермента и 0,02 мМ для мембранно-связанной формы. Эти факты указывают на наличие изоферментов триптофан-5-гидроксилазы в мозге. Фермент ингибируется хелатирующими агентами — ЭДТА, орто-фенантролином ( $K_i = 2$  мкМ), 8-оксихинолином, фенелзином. В активном центре фермента мозга находятся либо  $\text{Fe}^{++}$ , либо  $\text{Cu}^{++}$ . Эндогенным регулятором активности этой гидроксилазы является уровень серотонина в клетках. Высокие концентрации свободного серотонина в некоторых тканях ингибируют реакцию гидроксилирования триптофана. Однако серотонин, триптамин и тирамин не влияют на активность фермента мозга. В норме фермент насыщен субстратом всего на  $1/3$ . Величина  $K_m$  для триптофана намного больше, чем содержание аминокислоты в мозге. Таким образом, синтез серотонина в мозге зависит от концентрации триптофана в клетках. Существует обратное соотношение между степенью синтеза серотонина из меченого триптофана и уровнем экзогенного серотонина, которое наблюдается *in vivo* после предварительного торможения МАО. Эти факты не подтвердились в опытах *in vitro* с синапсосомами мозга крыс (Kagobath, 1972). Очевидно, надо учитывать возрастание скорости превращения ускоренно образующегося серотонина под действием МАО в конечный продукт его обмена — 5-оксииндолацетат. Интенсивность нервной импульсации, как и для ферментов синтеза катехоламинов, изменяет активность триптофангидроксилазы (Hamon, Glowinski, 1974).

Соли лития и дифенилгидантоин *in vivo* стимулируют синтез серотонина в мозге путем активизации гидроксилирования (Grahame-Smith, Green, 1974). Ионы кальция активируют растворимый фермент мозга крыс *in vitro*, снижая  $K_m$  для трипто-

фана и птеридина, тогда как другие двухвалентные ионы не влияют на его активность (Knapp et al., 1975). Эти данные могут указывать на возможность регуляции активности фермента при деполаризации терминалей серотонинергических нейронов. Растворимый фермент мозга активируют также некоторые фармакологические агенты — метиотепин, а также апоморфин. Производные морфина и амфетамина способны угнетать триптофан-5-гидроксилазу.

**5-Окситриптофандекарбоксилаза.** Декарбоксилаза  $\alpha$ -ароматических L-аминокислот катализирует декарбоксилирование 5-окситриптофана, ДОФА, гистидина и тирозина. Коферментом этой реакции является пиридоксальфосфат.

Региональное распределение декарбоксилазы, серотонина и частично МАО в мозге, как правило, совпадает. Наибольшая активность декарбоксилазы характерна для хвостатого ядра, предбугорной области и среднего мозга. Активность фермента обнаружена в головном мозге эмбрионов крыс, причем максимум ее предшествует моменту рождения. Почти 50% активности фермента находится в растворимой форме — в цитозоле нервных клеток, остальные 50% — в синапсосомах. В синапсосомах фермент локализован в цитоплазме, поскольку после гипоосмотического шока полностью солюбилизируется (de Robertis, 1965). Выявление фермента в СП (Semba, Civen, 1970) объясняется, по-видимому, неспецифическим его связыванием в ходе выделения. Ингибиторами фермента являются  $\alpha$ -метил-ДОФА, транилципрамин, аминазин. Есть все основания предполагать, что синтез серотонина происходит в цитоплазме терминалей из предшественников, после чего он депонируется в СП.

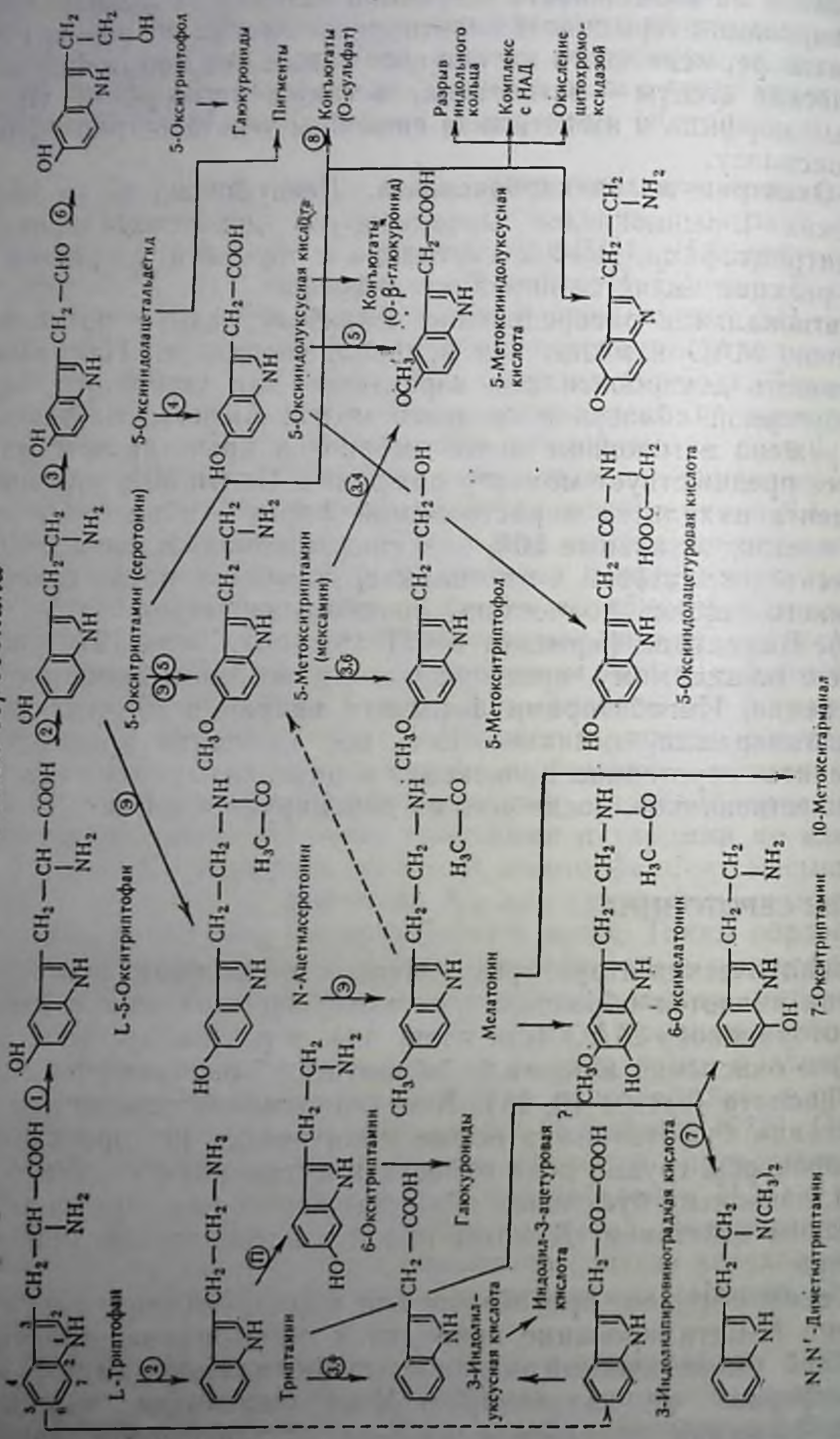
## ОБМЕН СЕРОТОНИНА

В синаптических структурах главным путем инактивации серотонина является обратный его захват терминалями и действие «серотониновой» МАО (см. главу 11), в результате чего, минуя стадию окисления альдегида, образуется 5-оксииндолил-3-уксусная кислота (схемы 10, 11). N-метилирования серотонина и образования буфотенина в норме практически не происходит, и эти процессы трудно пока отнести к путям инактивации серотонина, поскольку буфотенин обладает некоторым серотонинмиметическим действием. Данный процесс наблюдается при шизофрении.

Таким образом, при обмене как норадреналина, так и серотонина N-метилирование приводит к образованию продуктов с высокой биологической активностью. Фенилэтаноламин-N-метилтрансфераза не катализирует N-метилирование триптамина. Специфическая индолэтиламин-N-метилтрансфераза мозга, обнаруженная в синапсосомах (Morgan, 1969) и требующая нали-

# Схема 10

## Обмен серотонина<sup>1</sup>



<sup>1</sup> 1 — триптофангидроксилаза; 2 — 5-окситриптофандекарбоксилаза; 3 — MAO; 4 — альдегидредуктаза; 5 — оксиндолацетальдегиддегидрогеназа; 6 — альдегидредуктаза; 7 — индолэтиламин-N-метилтрансфераза; 8 — серотонин-О-сульфоксидаза; 9 — реакция в печени; 10 — реакция в эпифизе.

чия 5-аденозилметионина, лучше всего метилирует серотонин, несколько слабее 5-метокситриптамин и триптамин.

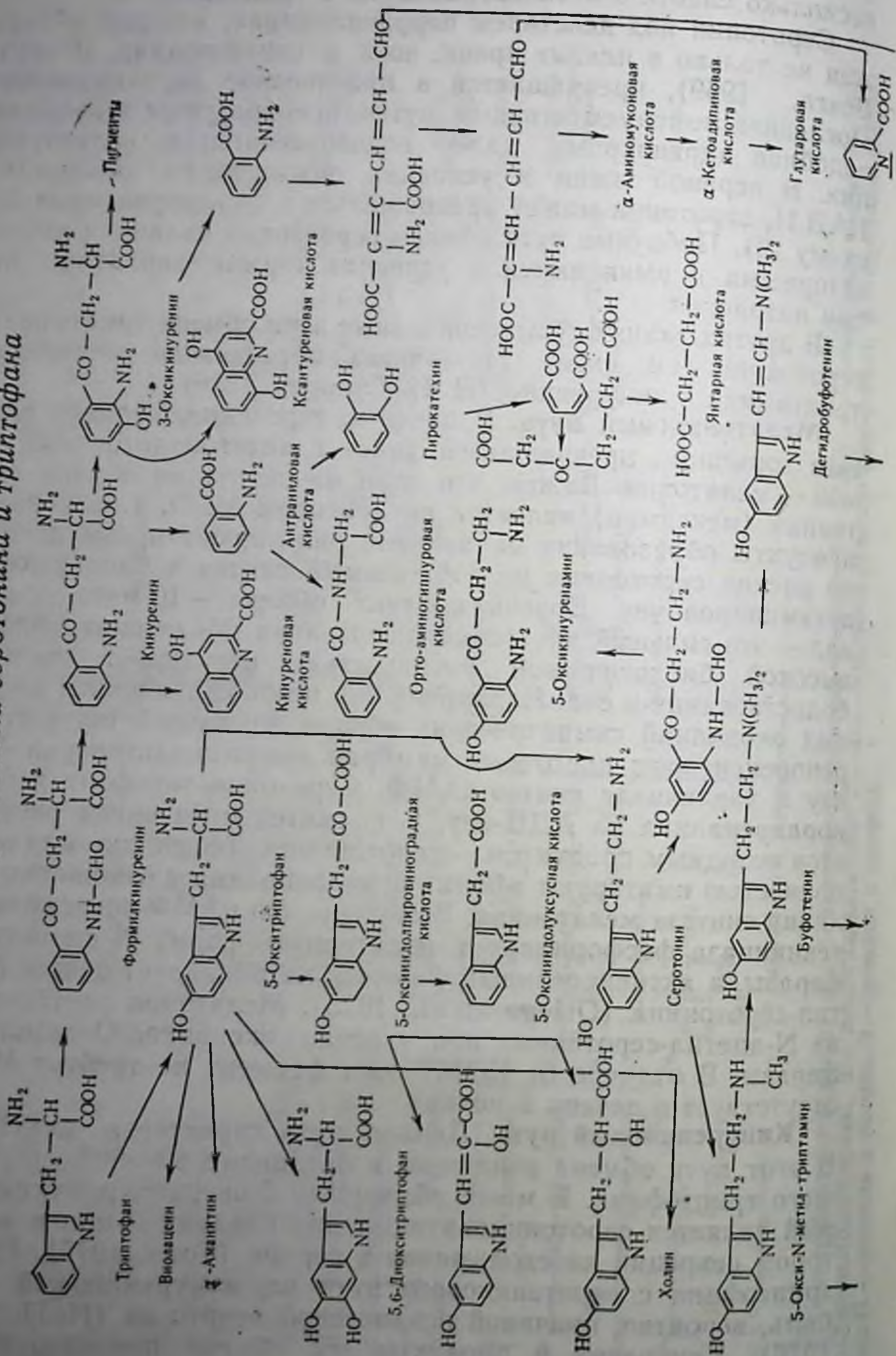
Серотонин под действием церулоплазмина, который обнаружен не только в плазме крови, но и в синапсосомах (Simons, Beaup, 1969), превращается в производное парахинонилина. Последнее неферментативным путем преобразуется в вещество, подобное адренохрому, далее подвергающемуся полимеризации. В нервной ткани в условиях повышенного образования НАДН<sub>2</sub> серотонин может превращаться в 5-окситриптофол (см. схему 10). Побочные пути обмена серотонина являются компенсаторными и выявляются в условиях торможения МАО либо при патологии.

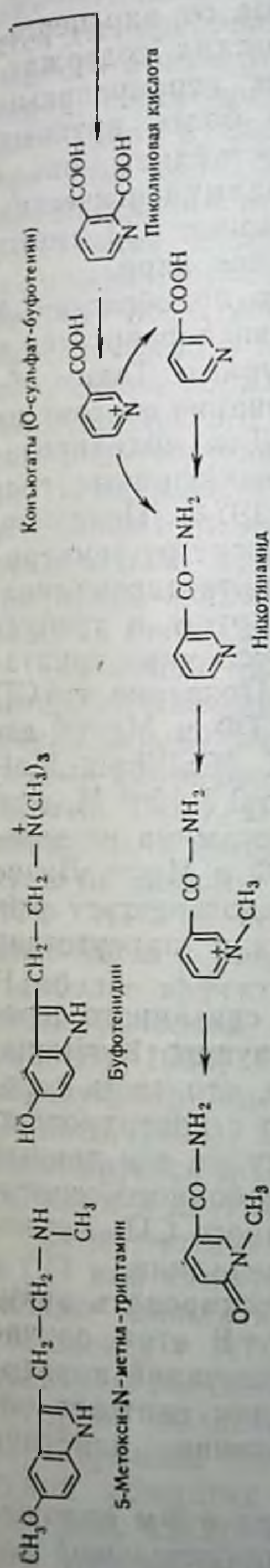
В других тканях существуют иные пути обмена триптофана и серотонина (см. схему 11) — через образование мелатонина, триптамина и кинуренина (Н. Н. Суворов, 1976).

**Мелатониновый путь.** В эпифизе серотонин, являясь тканевым гормоном, превращается далее в антигонотропный гормон — мелатонин. Важно, что один из продуктов обмена мелатонина (мексамин) является ингибитором МАО, т. е. конечные продукты образования мелатонина регулируют преимущественно расход серотонина на собственный синтез и блокируют его дезаминирование. Другой продукт обмена — 10-метоксигарманал — это сильный антагонист серотонина. Мелатонин обладает высокой биологической активностью, регулирует состояние бодрствования и сна. Норадреналин, освобождающийся из нервных окончаний симпатических нервов, взаимодействует с  $\beta$ -адренорецептором клеточных мембран эпифиза, активируя АДЦ-азу и увеличивая синтез цАМФ. Серотонин тормозит действие норадреналина на АДЦ-азу, т. е. синтез мелатонина регулируется исходным продуктом — серотонином. Теофиллин или цАМФ полностью имитируют эффект норадреналина в отношении регуляции синтеза мелатонина. Выяснено, что цАМФ-зависимая протеинкиназа фосфорилирует неактивную форму N-ацетилтрансферазы, а активированный фермент катализирует синтез N-ацетил-серотонина (Ortega et al., 1973). Мелатонин синтезируется из N-ацетил-серотонина при участии оксиндол-O-метилтрансферазы. В отличие от КОМТ этот фермент не требует  $Mg^{++}$  и отсутствует в печени и почках.

**Кинурениновый путь.** Данный путь характерен для печени. В этот путь обмена вовлечено в организме 80—90% поступающего триптофана. В мозге обнаружен 5-оксикинуренамин, который является серотонинолитиком для гладких мышц и модулятором секреции катехоламинов в сердце (Toda, 1975). Переход триптофана с серотонинового пути на кинурениновый может быть, вероятно, причиной психической депрессии (И. П. Лапин, 1976). Кинуренин и продукты его обмена противодействуют центральным эффектам серотонина и триптамина, тормозят аккумуляцию триптофана срезами мозга. Глюкокортикоиды инду-

Схема II  
Побочные пути обмена серотонина и триптофана





цируют синтез триптофанпирролазы, катализирующей образование формилкинуренина из триптофана, и тем самым способствуют образованию кинуренинов. В этих условиях в ряде отделов мозга действительно снижается концентрация серотонина. Повышение уровня серотонина в мозге животных зависит от степени торможения триптофанпирролазы, т. е. от того, насколько «перекрыт» кинурениновый путь. Механизмы переключения этих путей в мозге изучены пока недостаточно.

**Триптаминовый путь.** При декарбоксилировании L-триптофана в мозге образуется триптамин, из которого серотонин в организме не синтезируется. В микросомах печени триптамин может гидроксилироваться с образованием 6-окситриптамина. Наибольшее содержание триптамина обнаружено в мозжечке, коре и базальных ганглиях. Триптамин и его производные биологически активны, вызывают судороги и галлюцинации. Триптамин является антагонистом резерпина. Инактивация триптамина в мозге осуществляется под действием MAO с образованием индолил-3-уксусной кислоты. Возможно, что в генезе шизофрении триптаминовый путь имеет решающее значение. При субклеточном фракционировании триптамин обнаруживается в синапсосомах мозга животных (Phillips et al., 1974).

Феномен химической симпатэктомии, т. е. дегенерации серотонинергических нейронов, вызывают 6-оксисеротонин, 5,6-диокситриптамин и 5,7-диокситриптамин (Gerson, Baldessarini, 1975), замещающие серотонин в СП. При химической симпатэктомии у крыс наблюдается значительное увеличение привыкания к этанолу (Ho et al., 1974).

#### ДЕПОНИРОВАНИЕ СЕРОТОНИНА В СИНАПТИЧЕСКИХ ПУЗЫРЬКАХ

Содержащие серотонин СП морфологически и биохимически отличаются от СП, содержащих другие биогенные амины. Уль-

траструктура серотонинергических нейронов еще недостаточно изучена. В надперекрестном ядре гипоталамуса крысы обнаружены серотонинергические терминали, отличные от адренергических. В этих терминалях, как и в адренергических, содержатся два типа СП. Большая часть СП обладает агранулярным строением и имеет размер 35—55 нм, диаметр более крупных гранулярных СП, редко встречающихся, составляет около 140 нм, т. е. почти вдвое больше, чем в катехоламинергических окончаниях. В нейронах моллюсков серотониновые СП имеют диаметр 100 нм и содержат центральное плотное ядро.

Вновь синтезированный в терминалях или приобретенный путем обратного захвата серотонин активно транспортируется в СП и связывается с определенными их структурами. Таким образом, как и для других медиаторов, депонирование состоит из двух процессов: аккумуляции и связывания. Для моделирования везикулярного захвата использовали хромаффинные гранулы мозгового слоя надпочечников (Phillips, 1974). Показано, что процесс захвата серотонина гранулами зависит от температуры и протекает интенсивнее, чем процесс захвата адреналина. Данный процесс обусловлен активным транспортом и требует наличия в инкубационной среде АТФ; в этих условиях триптамин и гистамин гранулами не поглощаются. Показано, что СП хвостатого ядра мозга свиньи в присутствии АТФ и  $Mg^{+++}$  активно захватывали  $^{14}C$ -серотонин и  $^{14}C$ -ГАМК (Phillips, Matthaei, 1975). Значение  $K_m$  для серотонина равно  $0,7 \cdot 10^{-6}$  М, в то время как для ГАМК —  $1,3 \cdot 10^{-4}$  М. Захват гистамина не зависит от присутствия в инкубационной среде АТФ и  $Mg^{++}$ . Лизис СП, вызванный воздействием ультразвука, предотвращает усиленный захват серотонина, ГАМК и дофамина в присутствии АТФ и  $Mg^{++}$ .

При длительной инкубации СП мозга часть связанного серотонина высвобождается в среду инкубации (Maupert, Kugijama, 1964). Если это не артефакт, объясняемый тем, что часть серотонина непрочно связывается в опытах *in vitro* с поверхностью мембран СП и далее легко «смывается» в среду, то эти данные свидетельствуют о динамическом равновесии свободного серотонина в цитозоле нервных окончаний и захваченного СП. Аналогичные данные известны и в отношении норадреналина.

Резерпин, как и катехоламины, способен блокировать аккумуляцию серотонина в СП (и в тромбоциты). В этом случае свободный серотонин в цитоплазме нервных окончаний подвергается действию MAO. Таким образом, резерпин снижает общее содержание серотонина в тканях. Аналогичное действие оказывает тетрабеназин.

**Форма связи серотонина в СП.** Атом углерода в 3-м положении индольного кольца серотонина, несущий отрицательный заряд, обладает повышенной электронной плотностью. Расчеты указывают на то, что молекула серотонина должна быть хоро-



шим одновалентным донором электронов. Неферментативное окисление серотонина может приводить к образованию димера — меланинподобного пигмента. Результатом окисления является дегидрирование серотонина, после чего две молекулы окисленного амина реагируют друг с другом с образованием соединения, способного к восстановлению. Акцепторами серотонина могут быть нуклеотиды (особенно пиридиновые и флавиновые), при этом образуются комплексы с переносом заряда, удерживающиеся вместе за счет электростатического притяжения. Последующая электролитическая диссоциация этих комплексов возможна с образованием свободных радикалов. Возможно, что по типу неферментативного окисления серотонина различными окислителями в ткани (и даже в СП) из двух молекул окисленного амина образуется димер перекисного типа. Последний при наличии другого донора электронов (или источника водорода) способен восстанавливаться (М. Д. Курский, Н. С. Бакшеев, 1974). По мнению Bagondes (1962), серотонин, отдав свой электрон, может превращаться в альдегид, способный вновь восстанавливаться, не образуя димера. Таким образом, донорно-акцепторное взаимодействие макромолекул с серотонином имеет важный биологический смысл.

Серотонин находится в комплексе с АТФ в тромбоцитах, энтерохромоаффиноцитах желудочно-кишечного тракта, хромоаффинных гранулах клеток мозгового слоя надпочечников. Аналогичный комплекс существует и в нервной ткани (Taugber, Nesselbach, 1967). В опытах *in vitro* серотонин и АТФ образуют комплекс, в котором взаимодействуют ОН- и NH<sub>2</sub>-группы молекулы биогенного амина, пуриновое кольцо и фосфатный остаток АТФ. АТФ и серотонин образуют гидрофильно-гидрофобные комплексы с различной относительной молекулярной массой. Наиболее эффективно комплексообразование протекает при стехиометрическом соотношении 1 моль АТФ/2 моля серотонина (Roberts, 1966). Серотонин и АТФ в присутствии Mg<sup>++</sup> или Ca<sup>++</sup> образуют тройные комплексы, которые прочнее двойных (Maas, Colbun, 1965). Высказывались предположения, что серотонин депонируется в СП в форме комплексов с АТФ, связанных с белками и другими компонентами (Vogn et al., 1967).

Если считать связывание ацетилхолина или норадреналина в СП как комплекс с низкомолекулярными белками и АТФ, то можно ожидать, что и для связывания серотонина в форме комплекса с АТФ необходим белковый или белково-липидный носитель. Меченый серотонин, захваченный синапсом подбугорной области, определяется затем в форме комплекса с растворимым белком синапсом (отн. мол. м.  $5 \cdot 10^3$ ), причем такой комплекс характерен лишь для нервной ткани (Joanp, Le Cam, 1972). Впоследствии Tamig и соавт. (1976) доказали, что этот растворимый белок, имеющий отн. мол. м.  $10-20 \cdot 10^3$ , неидентичен белку S-100. Локализация этого белка совпадает

с региональным распределением серотонина. Связывание серотонина с этим белком нуждается в  $Fe^{++}$ . Большие дозы  $Fe^{++}$  ингибируют этот процесс. Это связывание является высокоспецифичным, поскольку  $K_{дисс}$  составляет  $10^{-8}$  М. Тиоловые реагенты, резерпин, винбластин и аналоги мескалина также тормозят связывание серотонина с растворимым белком. Пока нет доказательств, что выделенный белок локализован в СП.

Некоторые авторы рассматривают тромбоциты как экспериментальную модель для изучения свойств серотониновых СП. Связывание серотонина тромбоцитами блокируется NaF и опосредовано растворимыми белками, в частности гликопротеидами (Pignatti, Cavalli-Sforza, 1975).

## СЕКРЕЦИЯ СЕРОТОНИНА

Известно, что при раздражении преганглионарных волокон серотонин секретируется сердечными ганглиями моллюсков и симпатическими ганглиями позвоночных животных. Секреция потенцируется имипрамином — блокатором захвата биогенных аминов терминалями. Раздражение *in vivo* переднего конца изолированного спинного мозга лягушки вызывает накопление серотонина в перфузате из каудального отдела (Andén et al., 1964). При калиевой деполяризации или стимуляции электрическим током срезов мозга крыс (например, полосатого тела) можно наблюдать секрецию эндогенного и экзогенного серотонина. Секреция экзогенного меченого серотонина при стимуляции электрическим током срезов мозга животных наиболее интенсивна в том отделе мозга, в котором содержится наибольшее количество серотонина.

Удаление  $Ca^{++}$  из инкубационной среды практически полностью тормозит секрецию меченого серотонина (Saldate, Orgego, 1975). L-5-окситриптофан увеличивает спонтанное высвобождение серотонина из синапсом зрительной области коры мозга крыс или свиней. Данный эффект снимается ингибиторами 5-окситриптофандекарбоксилазы, что указывает на связь этого эффекта с синтезом серотонина и его пассивной утечкой из нервных окончаний (McBride et al., 1974).

## ОБРАТНЫЙ ЗАХВАТ СЕРОТОНИНА НЕРВНЫМИ ОКОНЧАНИЯМИ

После действия серотонина в синаптической щели на рецепторы пост-СМ инактивация амина осуществляется путем его активного захвата серотонинергическими нейронами. Серотонинергические нейроны виноградной улитки обладают высокоизбирательной системой захвата своего медиатора и его предшественника: сам серотонин транспортируется в терминали, а 5-окситриптофан — в тело нейрона; нейроны, не содержащие серотонина, не

захватывают эти вещества, а в их цитоплазме можно обнаружить лишь экзогенный триптофан (Pentreath, Cottrell, 1963). Синапсосомы мозга крыс способны пассивно и активно захватывать меченый L-триптофан (Grahame-Smith, Parfitt, 1970).

Активный захват триптофана умеренно блокируется циннами, убаином, дефицитом  $\text{Na}^+$  в инкубационной среде и конкурентно блокируется L-фенилаланином и L-триптофаном. Таким образом, триптофан является регулятором своей собственной системы транспорта в синапсосомах.

При инкубации 0,1 мМ  $^3\text{H}$ -триптофана со срезами мозга крыс цАМФ увеличивает его захват тканью и ускоряет тем самым синтез серотонина (Tagliamonte et al., 1971). Системы захвата серотонинергическими терминалями триптофана и серотонина различны (Kuhar et al., 1972).

При изучении связывания меченого серотонина срезами определенных структур мозга животных установлено, что основным фондом (более 60%) включенного амина приходится на синапсосомы (Blackburn et al., 1967). Резерпин, аминазин и убаин снижают содержание захваченного медиатора в синапсосомах. Активное поступление меченого серотонина по данным радиоавтографии происходит в определенные терминали, по-видимому, серотонинергических нейронов ядер шва мозга крыс, ганглиев и сердца аплизии (Kuhar, Aghajanian, 1973). Отношение содержания серотонина в ткани по сравнению с содержанием его в среде увеличивается в этих терминалях в 3—10 раз. На препаратах сердца аплизии показано избирательное накопление захваченного меченого серотонина в светлых СП диаметром 30—60 нм (Taxi, Gauton, 1969).

Выявлено наличие двух систем захвата серотонина: 1) высокоизбирательная система (захват-1) транспорта через пре-СМ, требующая низких концентраций серотонина в инкубационной среде и имеющая  $K_m$   $10^{-7}$  М; 2) пассивная, или низкоизбирательная, система (захват-2) транспорта с малым значением  $K_m$ , равным  $10^{-5}$  М (Iversen, 1970).

Синапсосомы коры мозга крыс для захвата-1 серотонина требуют наличия в инкубационной среде АТФ (Logan, Water, 1976). Bogdansky, Brodie (1966) впервые установили, что активный захват серотонина синапсосомами мозга крыс или кроликов имеет  $\text{Na}$ -зависимый характер и протекает интенсивно в инкубационной среде с соотношением  $\text{Na}/\text{K} \gg 1$ , например в растворе Кребса—Рингера. Снижение  $[\text{K}^+]_o$  или  $[\text{Na}^+]_o$  приводит к полному торможению захвата-1 серотонина. Калиевая деполяризация синапсосом снижает активное поглощение серотонина. Все перечисленные условия, а также ингибирующее действие убаина указывают на важность связи системы активного транспорта серотонина через пре-СМ с функцией  $\text{Na}$ ,  $\text{K}$ -АТФ-азы.

Выяснено, что блокаторами захвата-1 серотонина синапсосомами мозга животных являются резерпин, пара-бромметам-

фетамин. Последний сильнее блокирует захват серотонина, чем норадреналина и дофамина, синапсосомами среднего мозга, морского конька и полосатого тела мозга животных (Sanders-Bush et al., 1975). Специфическим ингибитором захвата-1 серотонина нервными окончаниями являются L-транс-3-(4-метоксифеноксиметил)-1-метил-4-фенилпиперидин, а также некоторые производные N-метил-3-фенилпропиламина. Из трициклических антидепрессантов, блокирующих активный захват серотонина терминалями, наиболее эффективен 3-хлоримипрамин, в то время как для норадреналина таковым является дезметилимипрамин (Shaskan, Snyder, 1970).

При изучении включения меченого серотонина в синапсосомы мозга животных трудно дифференцировать ингибирующее действие фармакологических агентов на захват-1 пре-СМ от связывания с рецептором пост-СМ. Учитывая это, можно объяснить данные о том, что серотонинолитики блокируют включение меченого серотонина в синапсосомы мозга крыс. 5-Окситриптофол является конкурентным блокатором захвата-1 для серотонина, но не для норадреналина.

Захват-1 серотонина только для серотонинергических терминалей, а захват-2 — для любых терминалей. Пассивный захват серотонина синапсосомами протекает и при температуре 0—4 °С (Vos et al., 1968). Эти свойства захвата-2 надо учитывать при изучении субклеточного распределения серотонина и других медиаторов при добавлении их в срезы и гомогенат в больших концентрациях.

Для захвата-1 серотонина синапсосомами характерно, что его максимум наблюдается в тех областях мозга, где больше всего этого медиатора. Например, скорость захвата-1 серотонина в синапсосомы полосатого тела в 2 раза больше, чем в синапсосомы подбугорной области крыс (Shaskan, Snyder, 1970). Максимум захвата-1 серотонина синапсосомами ствола мозга крыс в ходе онтогенеза достигается раньше, чем для синапсосом коры головного мозга (Nomuga et al., 1975).

## ДЕЙСТВИЕ СЕРОТОНИНА НА ПОСТСИНАПТИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

В коре, зрительном бугре, переднем и промежуточном мозге позвоночных проявляется тормозящее действие серотонина. Возбуждающее действие серотонин оказывает на нейроны коры зрительной области, боковых рогов спинного мозга и симпатических ганглиев, в то время как на парасимпатические нейроны спинного мозга серотонин оказывает тормозящее влияние. В боковом коленчатом теле и подбугорной области серотонин проявляет возбуждающий и тормозящий эффекты.

**Антагонисты серотонина.** Различают три типа серотонинорецепторов (И. Н. Пидевич, 1971; В. В. Закусов, 1973). К перво-

му типу относятся D-рецепторы, преимущественно гладких мышц и ЦНС. Литиками D-рецепторов являются производные лизергиновой кислоты (ЛСД, дигидроэрготамин, нохимбин); производные 1,2,3,4-тетра-гидро- $\gamma$ - (или  $\beta$ -)карболина (гармин); производные аминокиндолов (псилоцин, псилоцибин), триптамин, грамин и гармолан, также вещества неиндольной структуры: производные дибензиламина (дибенамин, резерпин, дибензиллин), фенотиазина (хлорпромазин).

Вторым типом серотонинорецепторов являются M-рецепторы, преимущественно для вегетативных ганглиев и ЦНС. Литиками являются четвертичные индолалкиламмониевые соединения (аналоги буфотенина), производные индолацетамидина и тиопираноиндола, а также вещества неиндольной структуры: производные морфина, дифенилметана (димедрол), тропана (кокаин, атропин). Третий тип серотонинорецепторов — это T-рецепторы, преимущественно окончаний афферентных нервов и тромбоцитов. Литиками в данном случае являются производные индолов (типиндол), а также производные индолацетамидина и гуанидина.

К серотонинолитикам в тканях мозга относятся также такие галлюциногены, как мескалин и производные тетрагидроканнабинолов (марихуана). Многие серотонинолитики являются психомиметическими средствами, действие которых на ЦНС многофазно. Так, в частности, они действуют и на адренергические нейроны, снижая концентрацию норадреналина в ткани. В зависимости от дозы некоторые психомиметические средства (ЛСД, мескалин и буфотенин) могут проявлять свойства серотониномиметиков. Действие морфина, атропина на серотонинорецепторы обратимо, действие дибенамина и производных триптамина необратимо. ЛСД и морфин являются конкурентными антагонистами серотонина.

Принято считать, что структура и функция серотонино- и адренорецепторов различны.

**Структура серотонинорецепторов.** Серотонин отличается от триптамина лишь наличием ОН- группы в 5-м положении индольного кольца. Этой разницы достаточно, чтобы триптамин не действовал как миметик. Считается, что серотониновый D-рецептор гладких мышц имеет по крайней мере три активных центра: 1) анионный — для связи с ионизированной  $\text{NH}_2$ -группой медиатора; 2) катионный — для взаимодействия с ионизированным гидроксилем серотонина; 3) ориентационный — для образования водородных связей с индольным азотом серотонина. Для проявления активности серотонина важное значение имеют 5-оксииндольное кольцо и длина боковой цепи; дислокация или отщепление ОН-группы в 5-м положении индольного кольца, а также удлинение или укорочение боковой цепи приводят к потере биологической активности серотонина (Beggidge, 1972). В структуре D-рецепторов гладких мышц SH-группы в

активном центре отсутствуют или не имеют существенного значения. Если комплексами связать Са, взаимодействие серотонина с рецептором не приведет к конечному эффекту, т. е. к сокращению гладких мышц. Отсюда следует, что реакция серотонина и рецептора должна реализовать высвобождение Са из мембран внутрь эффекторных клеток (Wooley, Gommi, 1964).

По данным Wild, Wooley (1967), в структуру рецептора входит дисналоганглиозид (тип G<sub>D3</sub>), содержащий по молекуле глюкозы и галактозы и 2 молекулы сиаловой кислоты. Обработка нейраминидазой или ЭДТА мембран мозга инактивирует связывание серотонина, а ганглиозиды обладают реактивирующим действием.

В модельных экспериментах показано, что серотонин и ганглиозиды мозга способны образовывать комплексы (van Neupingen, 1963), при этом зафиксированы кооперативные перестройки ганглиозидной мицеллы (А. Я. Вейнберг и др., 1975). Имеется предположение, что серотонинорецептором является комплекс белок — Са — липи (Wooley, Campbell, 1960).

Существует гипотеза, что серотонинорецептором может быть нуклеопротеид, так как серотонин связывается с РНК и тормозит РНК-полимеразу мозга (Siegal, Salinas, 1968). ЛСД также может связываться с ДНК и РНК. Smythies (1970) полагает, что мембранная РНК может взаимодействовать с простагландинами. Однако эта гипотеза представляется явно умозрительной.

Fischer, de Robertis (1969) показали, что максимумом связывания <sup>14</sup>С-серотонина обладают синаптические мембраны подбугорной области или базальных ганглиев кошки, причем ЛСД конкурентно вытесняет серотонин из участков связывания. При водно-бутаноловой экстракции данный рецептор попадает в бутанол. Он представляет собой гидрофобный протеолипид, не содержащий ганглиозидов и отличный от протеолипида, избирательно связывающего <sup>14</sup>С-тубокурарин.

В мозге серотонинорецептор содержит, по-видимому, SH-группу вблизи участков связывания с мечеными серотонином или аналогами морфина (Simon, Grotz, 1975), поскольку фиксация как фракцией синаптических контактов, так и синаптических мембран тормозилась тиоловыми реагентами. При исследовании связывания серотонина при 4 °С детергентным экстрактом синаптических мембран мозга крыс обнаружено два типа фиксации амина: первый, протекающий с насыщением ( $K_{дисс} = 5,3 \cdot 10^{-7}$  М), и второй, имеющий линейную зависимость ( $K_{дисс} = 1,1 \cdot 10^{-5}$  М). Первый тип фиксации блокируется ЛСД, триптамином, 5-метокситриптамином и тиоловыми реагентами, чувствителен к изменению температуры (Dette, Weseman, 1975). Два аналогичных типа связывания фракцией синаптических мембран описаны в отношении <sup>3</sup>Н-ЛСД. Серотонинорецептор, выделенный посредством хроматографии по сродству к произ-

водным ЛСД, существует в виде моно- и гексамеров с отн. мол. м. субъединиц  $35 \cdot 10^{-3}$  (Mehl, Weber, 1974). Связывание  $^3\text{H}$ -ЛСД серотонинореактивными структурами мембран мозга крыс (микросомы), максимальное для коры, морского конька и полосатого тела, не коррелировало с накоплением (захватом)  $^3\text{H}$ -серотонина, которое было максимальным в других структурах мозга (подбугорная область, миндалевидное тело, черная субстанция). Разрушение ядер шва среднего мозга крыс не изменяло количества участков связывания  $^3\text{H}$ -ЛСД с микросомами коры мозга, но значительно снижало захват-1  $^3\text{H}$ -серотонина синапсосомами коры мозга (Bennett, Snyder, 1975). Эти факты указывают на различную природу серотонинорецепторов пост-СМ и рецепторов пре-СМ, участвующих в переносе серотонина из среды в терминаль.

По-видимому, конечный физиологический эффект взаимодействия серотонина с рецептором пост-СМ или эффекторных клеток опосредован через цАМФ. Известно, что при действии серотонина на срезы ткани мозга крыс, обезьян, матки и сердца кроликов увеличивается содержание цАМФ, причем в срезах коры мозга крыс эффект блокируется серотонинолитиками (French et al., 1975). В клубочковой зоне надпочечников увеличение содержания цАМФ, вызванное серотонином, связано с синтезом альдостерона (Albano et al., 1974). При исследовании действия серотонина на синапсосомы коры мозга крыс накопление цАМФ опосредовано активацией АДЦ-азы (von Hungen, Roberts, 1973).

### 13. Медиаторные аминокислоты

---

#### РЕГИОНАЛЬНАЯ И СУБКЛЕТОЧНАЯ ЛОКАЛИЗАЦИЯ МЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ

Доля в ЦНС синапсов, содержащих такие медиаторы, как ацетилхолин и биогенные амины, невелика. Например, в полосатом теле мозга, богатом дофамином, только 15% дофаминергических нервных окончаний; в подбугорной области, где наивысший уровень норадреналина, только 5% нервных окончаний являются норадреналинергическими (Hökfelt, 1970). Доля серотонинергических синапсов в мозге меньше, чем норадреналинергических, доля холинергических синапсов составляет не более 10% от всех типов терминалей. Основным фондом синапсов в ЦНС составляют аминокислотергические синапсы. К медиаторным аминокислотам относят прежде всего ГАМК, глутаминовую кислоту и глицин, а также аспарагиновую кислоту, таурин и, возможно, пролин. По данным радиоавтографии ГАМК локализована главным образом в терминалях мозга, причем ее содержат 20—40% нервных окончаний различных его областей (Iversen, Bloom, 1972).

За исключением глутаминовой и аспарагиновой аминокислот, остальные аминокислоты проявляют свойства тормозящих медиаторов.

Медиаторные аминокислоты распределены более неравномерно по сравнению с другими в различных отделах



ЦНС (табл. 18). Отсутствие четкого гистохимического метода определения ГАМК затрудняет обнаружение ГАМК-ергических путей в ЦНС. У позвоночных животных ГАМК находится преимущественно в ЦНС. Значительные количества ее обнаружены в подбугорной области, бледном шаре, черной субстанции, хвостатом ядре, ядрах сетчатого образования, в некоторых отделах мозжечка, зрительном бугре. В спинном мозге животных ГАМК содержится в сером веществе задних и передних отделов. Концентрация ГАМК в гигантопирамидальных нейронах (клетки Беца) мозга кошек составляет 2,5 мМ, в длинноаксонных мультиполярных нейронах (клетки Дейтерса) — 6,3 мМ и в спинальных мотонейронах — 0,9 мМ. Больше всего глицина обнаружено в спинном мозге, особенно в сером веществе вентрального и дорсального рогов и дорсальной части белого вещества. Наличие глицина более характерно для вставочных нейронов, чем для нервных волокон или мотонейронов.

При субклеточном фракционировании мозга животных установлено, что основная часть ГАМК (до 60—80%) локализована в цитозоле клеток, другая (меньшая) часть находится в связанном состоянии в синапсосомах (Bálahs et al., 1966). По сравнению с другими медиаторами ГАМК имеется в мозге млекопитающих в довольно высокой концентрации. Это объясняется тем, что ГАМК, помимо медиаторной функции, играет важную роль в энергетических процессах.

Довольно низкое содержание ГАМК в синапсосомах по сравнению с гомогенатом (в отличие от синапсосом, содержащих классические медиаторы — ацетилхолин и норадреналин) может объясняться лабильностью ГАМК-ергических нервных окончаний, которые при гомогенизации мозга теряют часть ГАМК. Повысить количество связанной ГАМК удастся при гомогенизации в растворе сахарозы, содержащем  $\text{Na}^+$  и  $\text{Ca}^{++}$ .

Введение  $^3\text{H}$ -ГАМК в тормозящие аксоны мозга омара (Iversen, Kravitz, 1968) или инкубация срезов коры мозга крыс (Hökfelt et al., 1970) с  $^3\text{H}$ -ГАМК приводит при дальнейшем фракционировании к значительному накоплению ГАМК в нервных окончаниях, причем в последнем случае максимум радиоактивности в синаптических структурах обнаруживается в СП. Максимум накопления  $^3\text{H}$ -ГАМК при ее инкубации со срезами коры мозга крыс приходится на синапсосомы (30—40%).

После введения в мозг крыс  $^3\text{H}$ -ацетата в СП обнаружена значительная радиоактивность меченых ГАМК, глутамата и частично глутаминна (Faggow, O'Brien, 1971). Отсутствие четкой локализации эндогенных медиаторных аминокислот в СП, установленное некоторыми авторами (Rassin, 1972), можно объяснить малой устойчивостью СП, при выделении которых часть аминокислот высвобождается в среду. После введения  $^3\text{H}$ -глицина в спинной мозг радиоавтографически выявлено избирательное его накопление в светлых СП (Matus, Dennison, 1971).

Содержание медиаторных аминокислот и их аналогов  
в ЦНС млекопитающих (в микромолях) (Curtis, Johnston, 1974)

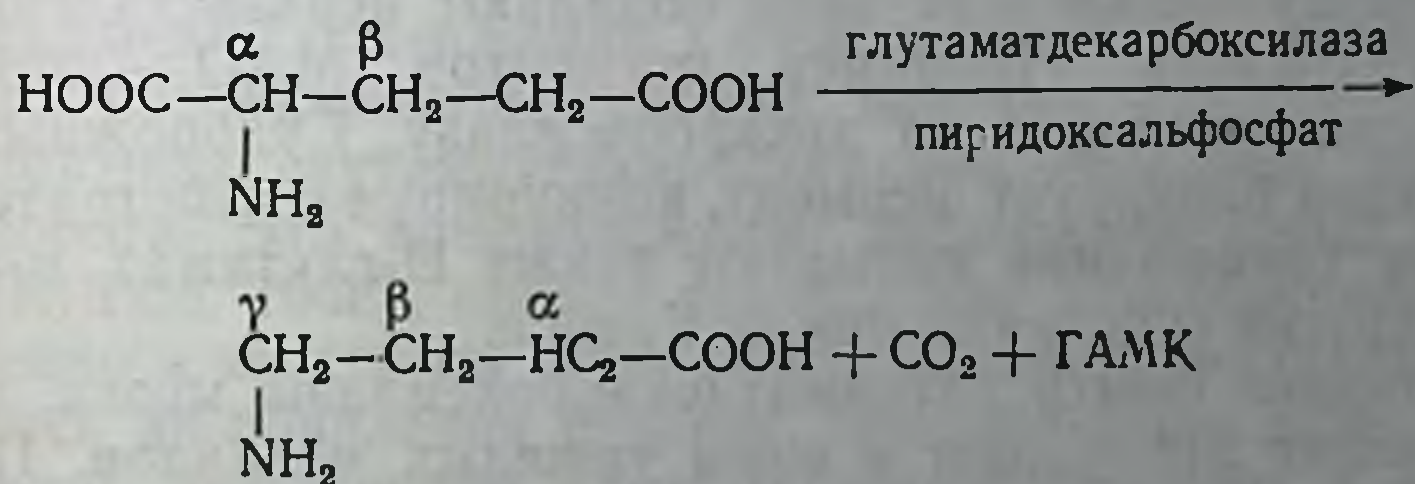
Объект	Аспарагиновая кислота	Глутаминовая кислота	ГАМК	Глицин	Таурин
Плазма	0,02	0,06—0,1	0,002—0,004	0,2—0,4	—
Спинально-мозговая жидкость	0,005—0,02	0,03—0,06	0,002—0,01	0,01—0,2	0,02
Кора головного мозга	3,1	12,9	1,4	1,3	1,9
Мозжечок	1,8—2,9	8,4—12,6	0,8—3,0	0,5—2,2	2,5—6,2
Серое вещество спинного мозга	2,6—4,4	5,2—5,9	1,6	6,0—6,4	0,1
Лобная область коры	1,9	8,9	1,9—2,9	1,4	1,3—2,1
Затылочная область коры	2,6	8,6	2,3—2,7	1,8	1,2—2,1
Височная область коры	1,9—3,1	10,8—12,9	1,4—2,1	1,3—2,0	1,6—2,1
Зона ассоциативной коры	1,5	6,0	0,9	0,6	1,3
Зона моторной коры	1,6	5,5	0,8—2,1	0,5	1,3
Зрительная область коры	1,8	5,9	1,0	0,6	1,7
Мозолистое тело	1,4	5,9—10,6	1,0	0,6	3,0
Новая кора	—	—	2,1	1,4	—
Зрительный бугор	2,4—2,7	8,4—12,4	2,1—4,5	1,7—2,4	1,1—2,8
Черная субстанция	—	—	4,2—10,1	—	—
Хвостатое ядро	—	—	1,9—3,8	—	—
Полосатое тело	—	—	2,7—3,6	—	—
Дорсальные пути спинного мозга (белое вещество)	1,1—1,9	3,7—4,8	0,4	2,3—3,0	—
Дорсальные пути спинного мозга (серое вещество)	1,5—3,9	4,7—6,5	2,1—2,2	4,1—5,7	—
Вентральные пути спинного мозга (белое вещество)	1,3—2,5	3,3—3,9	0,3—0,4	3,3—4,6	—
Вентральные пути спинного мозга (серое вещество)	2,4—4,8	4,4—5,3	1,0—1,3	5,0—7,1	—
Средний мозг	—	—	3,6	1,6—2,0	—
Ствол	—	—	1,7	3,0	—
Продолговатый мозг	—	—	1,6	3,4—4,0	—

Региональные колебания в распределении свободных аминокислот в мозге можно объяснить различием в соотношении нейрон/глия в тех или иных его областях. Изучение распределения фонда аминокислот имеет свои трудности: а) при инкубации срезов или фракций мозга в глюкозосолевой среде часть аминокислот вымывается; б) при расчете цитоплазматического фонда аминокислот на 1 мг белка следует учитывать значения отношения ядро/цитоплазма, разное для нейронов и нейроглии. Концентрация свободных аминокислот, в том числе и ГАМК, в синаптических везикулах высокая и составляет по одним данным 1—20 мМ (Bradford, 1970), по другим — для ГАМК синапсом грушевидных невронитов мозга кошек — 100 мМ (Fonnum et al., 1974).

Из данных табл. 18 видно, что большие количества глутамата содержатся в сером веществе дорсальных корешков спинного мозга и коре головного мозга.

#### ОБМЕН МЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ. СИНТЕЗ ГАМК. ГЛУТАМАТДЕКАРБОКСИЛАЗА

Глутаматдекарбоксилаза в мозге обнаружена в 1950 г. К образованию ГАМК приводит декарбоксилирование глутаминовой кислоты:



L-глутаминовая кислота.

Механизм реакции сложен. Реакция осуществляется при помощи кофермента пиридоксальфосфата, входящего в активный центр фермента.

При анализе субстратной специфичности оказалось, что в молекуле субстрата важно наличие COOH-группы в 1-м положении, α-NH<sub>2</sub>-группы, конечной группы полярной природы, атома водорода в α-положении, при замещении которого на CH<sub>3</sub>-группу происходит потеря активности фермента. Глутаматдекарбоксилаза мозга обладает исключительной субстратной специфичностью, фермент декарбоксилирует только L-глутамат при pH 6,4—7,6. Значение K<sub>m</sub> для субстрата сравнительно высокое и составляет 6,4—7,9 мМ. Фермент мозга представляет собой гексамер (отн. мол. м. 9·10<sup>4</sup>). Очищенный фермент малоустойчив и стабилизируется пиридоксальфосфатом и S-β-аминоэтилизотиурином (Matsuda et al., 1973).

Различают два типа глутаматдекарбоксилазы — локализованный в нервной ткани и в других тканях. Фермент мозга животных обратимо и конкурентно ингибируется тиосемикарбазидом, малочувствителен к торможению ГАМК, однако ГАМК репрессирует синтез фермента. Второй тип не является пиридоксальным ферментом. Этот фермент малочувствителен к ингибированию анионами, стимулируется тиосемикарбазидом и пируватом, локализован в митохондриях. В мозге второй тип фермента представлен в нейроглии. Нейрональный фермент *in vivo* находится в неактивном, диссоциированном (на мономеры) состоянии, который ускоряется  $\text{Cl}^-$  в отсутствие кофермента и веществ, защищающих SH-группы. Ингибирующее действие АТФ на фермент мозга (Turksky, 1970) объясняется тем, что в ее присутствии фермент обладает свойством отрицательной кооперативности (снижается чувствительность декарбоксилазы к недостатку субстрата).

Глутаматдекарбоксилазу мозга конкурентно ингибируют вещества, реагирующие с пиридоксальфосфатом: производные гидразидов (тиосемикарбазид), первичные фенилалкиламины с OH-группой в мета-положении (окситирамин, норадреналин), а также производные фенилаланина и неконкурентно, необратимо ингибируют салицилаты. Гидразиды инактивируют фермент посредством образования пиридоксаль-гидразонов. Специфическим ингибирующим действием обладают неразветвленные алкиларилгидразиды. Например, ингибитор МАО — ипрониазид практически не влияет на декарбоксилазу. Судорожный агент аллилглицин блокирует фермент, конкурируя с субстратом. Конкурентное торможение вызывают также D-глутамат,  $\alpha$ -кетоглутарат и другие субстраты цикла Кребса.

В активный центр глутаматдекарбоксилазы мозга, по-видимому, входят SH-группы и ионы тяжелых металлов. Пиридоксальфосфат в молекуле фермента связан с  $\epsilon$ - $\text{NH}_2$ -группой лизина. Максимум активности фермента в ЦНС обладают области промежуточного и среднего мозга, особенно черная субстанция и бледный шар. Как правило, ферментативная активность коррелирует с содержанием ГАМК. В ходе онтогенеза активность глутаматдекарбоксилазы мозга животных быстрее увеличивается, чем активность аминобутират-аминотрансферазы. Увеличение активности декарбоксилазы происходит одновременно с развитием дендритов.

Глутаматдекарбоксилаза мозга является цитозольным ферментом, т. е. локализована как в цитоплазматической фракции ткани мозга, так и преимущественно (50—85%) в синапсосомах мозга животных, точнее в его цитозоле (Bálahs et al., 1966). В митохондриях мозга фермент отсутствует. При фракционировании черной субстанции мозга кошки максимум активности фермента (до 85%) и содержания ГАМК определяется в синапсосомах (Foppim et al., 1974). Обнаружение декарбоксилазы в

СП (Foppit, 1968), по-видимому, надо считать артефактом, хотя следует признать, что мембраны СП *in situ* могут, очевидно, связывать глутаматдекарбоксилазу и обеспечивать более высокий уровень аккумуляции ГАМК в СП. Ионы кальция (0,5—4 мМ) активируют фермент синаптического происхождения, в связи с чем предполагается, что при возбуждении происходит более активный синтез ГАМК (Salganicoff, de Robertis, 1965; Lejoh, 1968). Глутаматдекарбоксилаза может считаться типично нейрональным ферментом, так как в глиальных клетках ее мало. По данным Sellström и соавт. (1975), при фракционировании коры мозга кроликов максимум активности декарбоксилазы определяется главным образом в синапсосомах, активность аминобутират-аминотрансферазы в клетках глии большая, чем в синапсосомах. Интересно, что аминоксиуксусная кислота ингибирует оба фермента, локализованные только в синапсосомах.

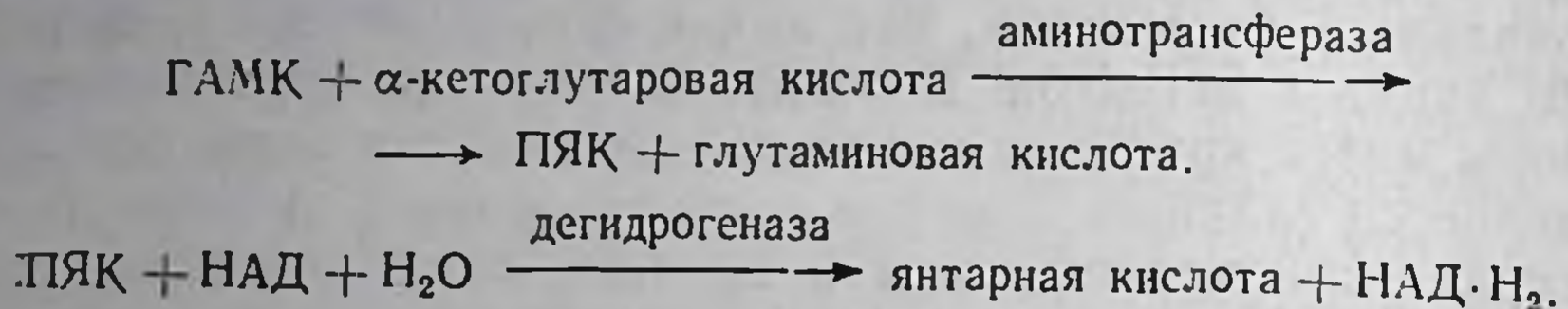
Значение  $t_{50}$  для ГАМК в мозге составляет 10 мин. Нарушения в обмене и балансе двух аминокислот — ГАМК и глутаминовой кислоты — имеют важное значение в генезе судорог. Недостаток в мозге витамина B<sub>6</sub> приводит к снижению активности пиридоксальзависимых ферментов. В результате в мозге уменьшается содержание ГАМК и увеличивается уровень глутамата. Следствием этого дисбаланса и особенно снижения содержания ГАМК является возникновение эпилептиформных судорог. Важно, что снижение содержания ГАМК в ткани мозга происходит до начала возникновения судорог, поэтому следует ожидать, что ингибиторы глутаматдекарбоксилазы способны инициировать судороги. Это предположение экспериментально подтвердилось (Killam, 1958), причем торможение декарбоксилазы мозга (особенно в хвостатом ядре), вызываемое гидразидами, обнаруживалось до появления судорог. Позднее было доказано, что соотношение активностей глутаматдекарбоксилазы и аминобутират-аминотрансферазы является важным фактором в генезе судорог. Отсюда ясно, что ГАМК обладает противосудорожными свойствами.

В эмбриогенезе грызунов декарбоксилаза выявляется в нейронах мозжечка при формировании синапсов, причем в течение первых дней постнатального развития фермент еще не концентрируется в нервных окончаниях (McLaughlin et al., 1975). По другим данным (Davies et al., 1975), ГАМК и глицин начинают функционировать как медиаторы с первого дня постнатальной жизни крыс.

Согласно гипотезе Roberts (1968), глутаматдекарбоксилаза может функционировать на внешней стороне пост-СМ для преобразования возбуждающего действия глутамата в синаптической щели в тормозящее путем превращения в ГАМК. Для подтверждения этой гипотезы привлекаются факты накопления свободной, внеклеточной ГАМК в мозге при действии гидразидов (Tarja, Awарага, 1967). Эта гипотеза привлекательна, но она

неверна, потому что декарбоксилаза — цитозольный фермент и не обнаруживается в синаптических мембранах.

**Аминобутират-трансаминаза.** Обратную реакцию переаминирования ГАМК с  $\alpha$ -кетоглутаратом и образованием глутамата и полуальдегида янтарной кислоты (ПЯК), вовлекающегося затем во вторую фазу цикла Кребса, катализирует в мозге аминок-бутират-трансаминаза:



Таким образом, ГАМК входит в цикл Кребса на уровне сукцината (Roberts, 1962), т. е. основной путь обмена ГАМК в мозге — переаминирование. В активный центр аминотрансферазы мозга входят пиридоксальфосфат, SH-группа и  $\text{Fe}^{+++}$ . Образовавшийся пиридоксамин реагирует с  $\alpha$ -кетоглутаровой кислотой, которая превращается в глутамат. Реакция достаточно сложная и протекает многоступенчато. Около 8% суммарного  $\text{CO}_2$  в цикле Кребса в мозге выделяется за счет переаминирования ГАМК.

Переаминирование ГАМК в мозге протекает наиболее активно при pH 8,2. Косубстратами, кроме  $\alpha$ -кетоглутарата ( $K_m$  составляет 2—5 мМ), могут быть пируват,  $\delta$ -аминовалерьяновая и щавелевоуксусная кислоты. Очищенный фермент мозга животных состоит из изоферментов, причем катионные формы более активны, чем анионные. Некоторые изоферменты аминотрансферазы находятся в цитозоле. Ингибиторами фермента мозга являются блокаторы SH-групп или карбонильных групп пиридоксальфосфата: гидроксилламин и его производные, особенно аминоксиуксусная кислота; производные гидразина, особенно 3-гидразинпропионовая кислота ( $K_i = 2,3 \cdot 10^{-7}$  М), а также циклосерин. Производные гидроксилламина и циклосерин гораздо сильнее ингибируют аминотрансферазу, чем глутаматдекарбоксилазу. С другой стороны, многие производные гидразина, наоборот, сильнее тормозят глутаматдекарбоксилазу, чем аминотрансферазу. Аналог циклосерина цис-5-карбоксиметил-4-аминоизооксалилон-3 полностью тормозил аминотрансферазу, но не влиял на декарбоксилазу (С. Е. Северин и др., 1968). Колебания в уровне ГАМК в большей степени зависят от активности глутаматдекарбоксилазы. Оба фермента являются пиридоксальфосфатами, однако аминотрансфераза более подвержена действию блокаторов пиридоксина, карбонильных реагентов и различных антагонистов ГАМК. Если введение ингибиторов декарбоксилазы снижает содержание ГАМК в мозге (в основном во внекле-

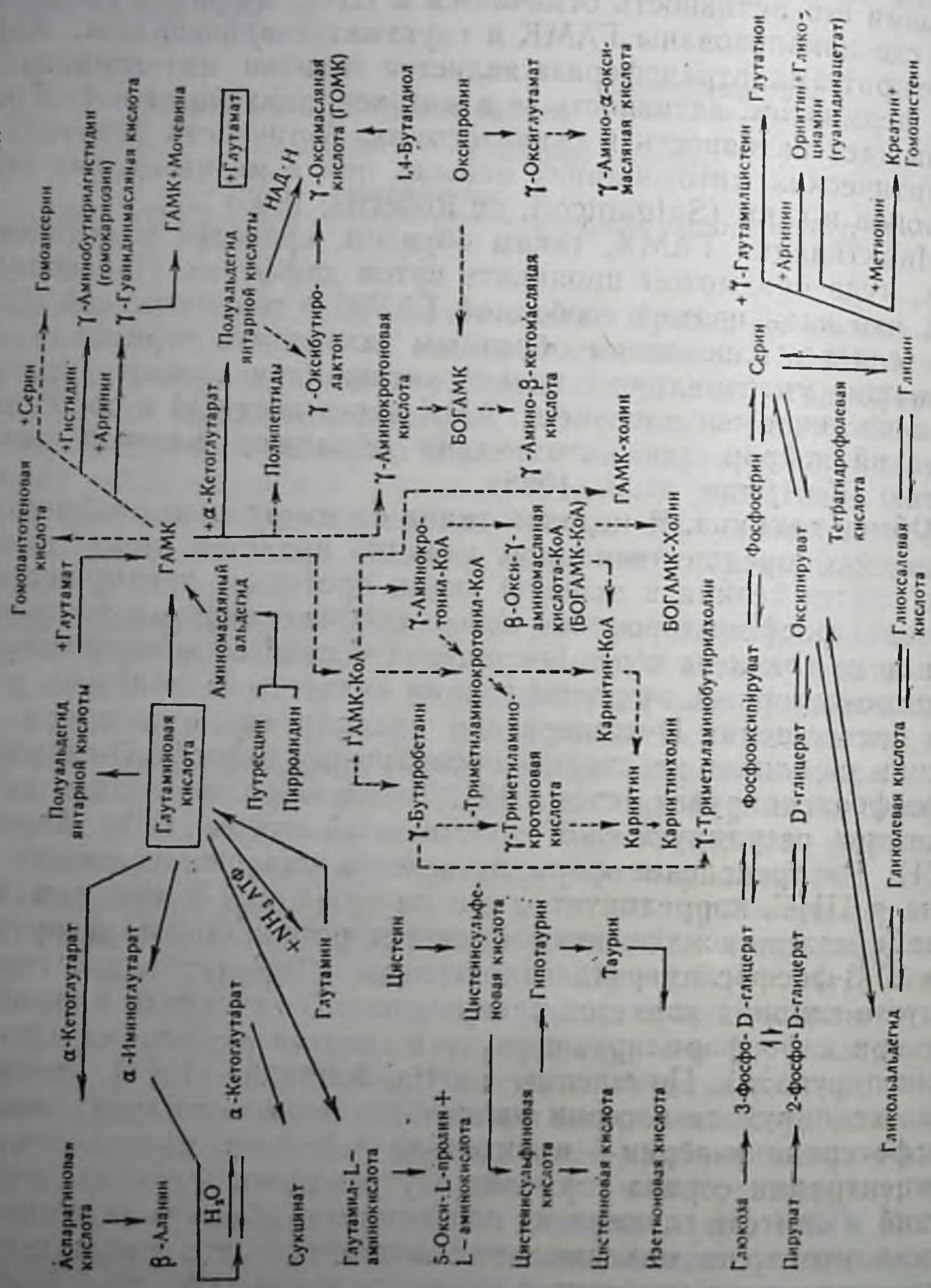
точной среде), то введение ингибиторов аминотрансферазы приводит к увеличению уровня внутриклеточной ГАМК. В большинстве случаев содержание ГАМК в мозге увеличивается преимущественно за счет ее свободной (внеклеточной) формы.

Фермент обнаружен во многих органах животных, но наибольшая его активность отмечается в ЦНС, именно в тех отделах, где локализованы ГАМК и глутаматдекарбоксилаза. Аминобутират-аминотрансфераза является типично митохондриальным ферментом, активность ее в митохондриях мозга в 4—5 раз превышает активность в синапсосомах. Активность фермента в синаптических митохондриях меньше, чем в митохондриях тела нейронов и глии (Salganicoff, de Robertis, 1965).

Инактивация ГАМК, таким образом, проходит в митохондриях, куда она может проникать путем диффузии. Предполагается, что инактивация свободной ГАМК в синаптической щели определяется в основном обратным захватом в терминали, содержащие митохондрии с низкой активностью аминотрансферазы, и частично поглощением ГАМК через пост-СМ в постсинаптический нейрон, где митохондрии обладают высокой активностью (Kugijama et al., 1968).

**Обмен глицина.** В нервной ткани он имеет свои особенности. Во-первых, предшественником глицина является серин; во-вторых, синтез серина в нервной ткани протекает преимущественно через фосфорилирование глюкозы. Синтез серина из пирувата или из глюкозы через D-глицерат — процесс дополнительный и компенсаторный, при этом глицин является ингибитором реакции превращения D-глицерата в оксипируват, в то время как глицин не влияет на стадию превращения 3-фосфо-D-глицерата в фосфооксипируват (схема 12). Таким образом, глицин неконкурентно регулирует свой собственный синтез (Uhr, Sneddon, 1971). Распределение ферментов, катализирующих синтез глицина в ЦНС, коррелирует с его содержанием в том или ином отделе мозга; исключением является региональное распределение D-3-фосфоглицератдегидрогеназы. Лимитирующей стадией синтеза глицина является превращение D-глицерата в оксипируват при нефосфорилирующем пути синтеза серина из глюкозы (или пирувата). По мнению Curtis, Johnston (1974), превращение оксипирувата в серин происходит в митохондриях мозга, а фосфосерина в серин — в цитозоле нейронов, причем большие концентрации серина тормозят эту реакцию. Фермент, участвующий в синтезе глицина из глиоксилата, обнаружен в синапсосомах мозга, но максимальная активность его наблюдается в митохондриях и особенно в цитозоле нервных клеток. В синапсосомах мозга отмечена активность и другого цитозольного фермента, катализирующего синтез глицина из серина. Таким образом, в нервных окончаниях синтез глицина может происходить различными путями.

Схема 12. Обмен медиаторных аминокислот в нервной ткани<sup>1</sup>



<sup>1</sup> Сплошные линии — доказанные реакции, прерывистые — предполагаемые.



## КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИЯ ФОНДА ГАМК, ГЛУТАМАТА, ГЛУТАМИНА

Важное значение имеет пространственное разобщение обмена ГАМК, глутамата и глутамина в ЦНС, т. е. компартментализация. В опытах с меченой глюкозой на срезах мозга животных показано, что синтезируется прежде всего глутамат, затем аспартат и после них ГАМК. Все процессы зависят от природы добавляемых в среду субстратов окисления и от рН среды. Синтез ГАМК в мозге повышался только в присутствии глутамата. Дополяризирующее воздействие КСІ при инкубации срезов мозга с  $^{14}\text{C}$ -глюкозой приводит к увеличению синтеза глутамата, ГАМК и глутамина (Gonda, Quastel, 1962).

При инкубации срезов мозга или синапсом с  $^{14}\text{C}$ -глутаматом (Bradford, Thomas, 1969) основными продуктами обмена являются ГАМК (до 10%), аспартат, аланин и в меньшей степени глутамин (особенно в синапсомах). Несмотря на высокую активность глутаматдекарбоксилазы, количество новообразованной ГАМК в синапсомах относительно мало. Добавление в среду пиридоксаль-5-фосфата резко ускоряет синтез ГАМК. Длительная инкубация синапсом коры мозга в течение часа при  $37^\circ\text{C}$  с 10 мМ глюкозы способствует значительному накоплению глутамата, а также ГАМК и аланина и снижению содержания аспартата и  $\text{NH}_4^+$  (Benjamin, Quastel, 1975). Убаин вызывает, по-видимому, благодаря усилению входа  $\text{Ca}^{++}$  в клетки накопление глутамата, ГАМК,  $\text{NH}_4^+$  (может быть, за счет усиления активности глутаминазы) и снижение содержания глутамина. Аналогичные факты о регуляции обмена медиаторных аминокислот в нервных окончаниях получены при калиевой деполяризации и стимуляции электрическим током синапсом.

Глутамат превращается в аспартат и  $\alpha$ -кетоглутарат в результате обратимой реакции переаминирования с оксалоацетатом при помощи аспартат-аминотрансферазы. Этот фермент, по данным de Robertis (1967), специфически распределен в синаптических структурах: в нервных окончаниях фермент локализован в цитозоле, а в теле нейрона — в цитозоле и митохондриях. Активность аминобутират-аминотрансферазы в мозге составляет менее 1% по сравнению с активностью аспартат-аминотрансферазы.

Глутаминаза мозга катализирует в митохондриях синтез глутаминовой кислоты из глутамина при помощи дезаминирования. Активность этого фермента в синапсомах мозга составляет 30% от активности его в гомогенате. Фермент активируется анионами сульфата, карбоната или фосфата, что характерно для глутаминазы нервной ткани в отличие от других тканей, и тормозится  $\text{NH}_4^+$ . Момеры глутаминазы мозга (отн. мол. м.  $12 \cdot 10^4$ ) в присутствии анионов фосфата превращаются в олигомер с более высокой активностью. Половина количества (50%)

глутамин в синапсосомах превращается в присутствии глюкозы в глутамат, ГАМК и аспартат (Bradford, Ward, 1976). В митохондриях инактивация глутамин осуществляется переаминированием в присутствии оксалоацетата. В результате образуется аспартат, аммиак и  $\alpha$ -кетоглутарат. Инактивация глутамата в синапсах осуществляется глутаминсинтетазой (отн. мол. м.  $5 \cdot 10^5$ , состоит из 8 субъединиц). Фермент в присутствии  $\text{NH}_3$  и Mg-АТФ превращает глутамат в глутамин. Глутаминаза и глутаминсинтетаза — ферменты, регулирующие обмен аммиака в мозге. При возбуждении ЦНС, как правило, количество  $\text{NH}_3$  в мозге возрастает, а при торможении (при сне) — уменьшается.

Глутамин имеет важное значение в обмене медиаторных аминокислот, так как в отличие от ГАМК и глутамата достаточно хорошо проникает в мозг через гематоэнцефалический барьер.

Исходя из того, что активность глутаминсинтетазы выше в микросомах мозга, чем в синаптических мембранах (Salganicoff, de Robertis, 1965), можно сделать вывод, что глутамат синаптической щели, захваченный нервными окончаниями, в небольшой степени подвергается превращениям и связывается в основном в СП, в то время как глутамат, захваченный эффекторными клетками, быстро превращается в цитоплазматической сети в глутамин. В глутаматергических нейронах, исходя из принципа Дейла, синтез медиатора осуществляет, по-видимому, глутаминаза, а не аминобутират-аминотрансфераза, в то время как инактивирующим фактором является преимущественно глутаминсинтетаза.

Глутаматдегидрогеназа катализирует в присутствии  $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$  превращение глутамата в  $\alpha$ -кетоглутарат и аммиак. Этот фермент митохондрий мозга (отн. мол. м.  $1,2 \cdot 10^6$ ) состоит из 4 субъединиц, активируется АДФ и  $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$  и тормозится пиридоксальфосфатом, причем последний эффект снимается в присутствии ГАМК. Неактивный тетрамер переводится в активную форму до мономеров в присутствии  $\text{НАДФ} \cdot \text{H}_2$  или  $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ . Активность этой дегидрогеназы во внесинаптических митохондриях выше, чем в синаптических.

Согласно гипотезе Waelsch (1961), существует два фонда глутамата в мозге: фонд глутамата, превращающегося при действии глутаминсинтетазы в глутамин, и превращающегося в ГАМК. Bálazs и соавт. (1970) показали, что ГАМК также имеет два фонда: малый, с высокой скоростью обмена, локализованный в нервных окончаниях, и большой, с низкой скоростью обмена, локализованный в нейроглии и перикарионе нейронов. В нервных окончаниях и телах нейронов глутамат активно превращается соответственно в сукцинат и в глутамин и в небольшой степени в ГАМК, который активно окисляется в сукцинат. В нейроглии глутамат медленнее переходит в глутамин и ГАМК, чем в аспартат и  $\alpha$ -кетоглутарат. Rose (1970) считает, что боль-

Синаптические функции некоторых аминокислот и их структурных аналогов  
(Curtis, Gohnston, 1974; Segal, Bloom, 1974)

Аминокислоты и их аналоги	Содержание, свойства и функции в мозге
L-α-аланин	Глицин-миметик. Не секретируется срезами мозга при стимуляции электрическим током
β-Аланин	Глицин-миметик в спинном мозге, в головном мозге является также и ГАМК-миметиком
Пролин	Гиперполяризация нейронов коры и морского конька
Цистатионин	Образуется из гомоцистеина и серина, превращается в цистин; отсутствует в других тканях, помимо нервной. Глицин-миметик
Гипотаурин	Тормозящее действие в спинальных мотонейронах; фермент синтеза (из цистеинсульфината) обнаружен в синапсосамах
β-Окси-γ-аминомасляная кислота	Содержание в мозге снижается при судорогах; ГАМК-миметик; активно захватывается срезами мозга, как и ГАМК
γ-Гуанидомасляная кислота	Накапливается при судорогах; возбуждение аксодендритических синапсов коры
α-Аминобутирилхолин (ГАМК-холин)	Холинолитик в подбугорной области и нервно-мышечных синапсах позвоночных, возбуждающий холиномиметик в морском коньке, тормозящий холиномиметик в нейронах моллюсков, М-холиномиметик в гладких мышцах позвоночных и мышцах ракообразных, ГАМК-миметик у позвоночных
γ-Бутиробетанин	Холинолитик в сердце лягушек
Карнитин	Блокада нервно-мышечных синапсов позвоночных; как и γ-бутиробетанин и ГАМК-холин, возбуждает М-холинорецепторы в мышцах ракообразных
Ацетилкарнитин	Содержится (9% по сравнению с ацетилхолином) в нервных окончаниях, иннервирующих мышцы лягушек
Гомокарнозин	Высокое содержание в мозге человека
γ-Оксимасляная кислота	Пролонгирует действие наркотиков, регулирует фазу парадоксального сна. Тормозит передачу в аксодендритических и облегчает ее в аксосоматических синапсах; тормозит секрецию дофамина
Таурин	Значительные количества в сетчатке, коре мозга, сердце. В синапсосамах коры мозга содержится до 27% по сравнению с гомогенатом. Тормозящее постсинаптическое действие. Глицин-миметик в спинном и продолговатом мозге, в других отделах головного мозга ГАМК-миметик
L-цистеиновая кислота	Деполаризация спинальных мотонейронов, дегенерация нейронов подбугорной области

Аминокислоты и их аналоги	Содержание, свойства и функции в мозге
Аспарагиновая кислота	Вызывает, как и глутамат, при системном введении судороги и дегенерацию нейронов сетчатки и подбугорной области; превращается в глутамин; обратимая деполяризация спинальных мотонейронов. Глутамин-миметик. В зрительном бугре и спинном мозге, по-видимому, существуют рецепторы в пост-СМ для аспартата, отличные от рецептора для глутамата
N-ацетил-L-аспартат и N-ацетиласпартилглутамат	Обнаружены в синапсоммах мозга, функция не установлена

шой фонд глутамата с низкой скоростью синтеза глутамина находится в теле нейрона, а малый по объему фонд — в глии и нервных окончаниях. Последнее утверждение опровергается данными Vegl и соавт. (1968) о большой скорости обмена глутамина. Компартиментализация ГАМК, глутамата и глутамина играет важную роль в осуществлении быстрой перестройки обмена веществ с системе синапс—тело нейрона—нейроглия. Глутамат, введенный *in vivo* в мозг, вовлекается в малый фонд, где превращается в глутамин. По-видимому, малый фонд глутамата в нейроглии является дополнительной системой инактивации глутамата как передатчика в синаптической щели. Компартиментализация системы ГАМК возникает после созревания нервной системы.

Некоторые производные ГАМК, другие структурные аналоги аминокислот обладают высокой биологической активностью (табл. 19).

#### СВЯЗЫВАНИЕ И ФОРМА ХРАНЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ В СИНАПТИЧЕСКИХ ПУЗЫРЬКАХ

Фракция СП коры мозга содержит значительные количества свободных глутамата и таурина (de Bellegoche, Bradford, 1973). Эти аминокислоты более прочно связаны с белками СП, чем ацетилхолин, вследствие чего в меньшей степени выделяются в инкубационную среду при осмотическом шоке СП. Инкубация в среде с 56 мМ КСl ускоряла спонтанное высвобождение аминокислот, особенно таурина. По данным авторов, таурин, как и глутамат, входит в состав внутривезикулярного фонда, а не является следствием неспецифической адсорбции аминокислот мембранами. Популяция СП мозга мышей, связывающих ГАМК, отлична от СП, связывающих ацетилхолин, по механизму погло-

шения (Vos et al., 1968). Поглощение ГАМК фракцией СП максимально в среде, содержащей 50 мМ NaCl. Тормозится поглощение ГАМК резерпином. Структурные аналоги ГАМК хуже поглощаются в СП, чем ГАМК. Поглощение ГАМК может быть активным и пассивным. Авторы объясняют депонирование ГАМК наличием полианионов в СП. Форма хранения медиаторных аминокислот в СП пока неизвестна.

## СЕКРЕЦИЯ МЕДИАТОРНЫХ АМИНОКИСЛОТ

При стимуляции грушевидных невронитов в коре мозжечка в перфузате IV желудочка резко увеличивается количество эндогенной ГАМК (Obata, Takeda, 1969), что свидетельствует о ее секреции. Количество секретируемых эндогенных медиаторных аминокислот коррелирует с интенсивностью импульсов в соответствующих нейронах (Curtis, Johnston, 1974).

При инкубации синапсом спинного или продолговатого мозга крыс в растворе Кребса—Рингера наблюдается спонтанное высвобождение эндогенных аминокислот, большей частью медиаторных. Дефицит  $\text{Na}^+$  в среде или действие пара-хлормеркуробензоата усиливали высвобождение медиаторных аминокислот. Кроме того, указанные воздействия потенцировали эффект стимуляции электрическим током синапсом в отношении секреции аминокислот, особенно ГАМК и глутамата (Osborne, Bradford, 1975). При исследовании спонтанного высвобождения  $^3\text{H}$ -ГАМК из синапсом коры мозга крыс обнаружено две системы (Simon et al., 1974). Одна система не зависела от  $[\text{Na}^+]_o$ , а другая зависела от  $[\text{Na}^+]_o$ , концентрации захваченной синапсом ГАМК и температуры. Вторая система является активной и, возможно, требует участия переносчика. По-видимому, система обратного захвата аминокислот в терминали и система высвобождения различаются между собой. Введение в инкубационную среду немеченой ГАМК значительно увеличивает скорость высвобождения  $^3\text{H}$ -ГАМК из синапсом. Эти эффекты объясняются гомологичным обменом свободной немеченой и меченой ГАМК синапсом. Гомологичный обмен ускоряется в безнатриевой среде.

Collins (1974) на изолированном спинном мозге показал, что один антагонист ГАМК — бикукулин — активирует, а другой — пикротоксин — тормозит высвобождение  $^3\text{H}$ -ГАМК из ткани. Эти данные могут указывать на то, что уровень секреции ГАМК зависит от формирования и функционирования ГАМК-рецептора как пост-СМ, так и пре-СМ.

Путем стимуляции электрическим током, а также при действии KCl или вератрина на срезы или синапсомы головного и спинного мозга удалось продемонстрировать вызванную сек-

рецию всех медиаторных аминокислот: ГАМК, таурина, глутамата, аспартата, глицина и пролина. Стимуляция электрическим током невозбудимых тканей (срезы почек, печени) не вызывает секреции аминокислот. При стимуляции током или калиевой деполяризации срезов спинного или коры головного мозга крыс немедиаторные аминокислоты не секретировываются (Snyder et al., 1973). Секрецию  $^{14}\text{C}$ - $\alpha$ -аминоизобутирата наряду с  $^3\text{H}$ -ГАМК при стимуляции электрическим током срезов новой коры крыс (Orrigo, Miranda, 1976) можно объяснить способностью первого замещать ГАМК в СП нервных окончаний.

Этанол блокирует секрецию медиаторов, вызванную стимуляцией электрическим током срезов коры мозга крыс, при этом ингибирующий эффект убывает в ряду ацетилхолин > серотонин > дофамин > норадреналин > глутамат > ГАМК.

Максимальная интенсивность секреции ГАМК, глутамата и глицина при калиевой деполяризации срезов головного и спинного мозга проявляется спустя 10—14 дней после рождения крыс (Davies et al., 1975). Эндогенный глицин более интенсивно секретировывается срезами спинного мозга крыс, а ГАМК и пролин — срезами коры головного мозга (Mulder, Snyder, 1974). При деполяризации повышается содержание в ткани некоторых медиаторов, что свидетельствует об увеличении их синтеза вследствие компенсаторной реакции терминалей в ответ на возбуждение (Н. Г. Алексидзе, Д. Ф. Мешвелишвили, 1969; Bradford et al., 1973). Синапсомы мозга по сравнению со срезами или изолированными нервами являются удобной моделью изучения секреции аминокислот, так как экзогенные (и эндогенные) аминокислоты (ГАМК и глутамат) при деполяризации, например, симпатических ганглиев крыс (Bowery, Brown, 1972) или препаратов дорсальных корешков спинного мозга кошек (Minchin, Iversen, 1974) могут высвободиться и из глиальных клеток.

Пожалуй, самая главная особенность секреции медиаторных аминокислот — это  $\text{Ca}$ -зависимая ее природа. Впервые это было доказано для экзогенной секреции ГАМК при стимуляции электрическим током тормозящих нервов омара (Otsuka et al., 1966).

Зависимость секреции эндогенных или экзогенных медиаторных аминокислот от  $\text{Ca}^{++}$  изучена при деполяризации срезов, синапсомом головного или спинного мозга (Bradford, 1975). При калиевой деполяризации или действии вератридина исследовали секрецию  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синапсомомами мозга крыс (Levy et al., 1974). Оказалось, что  $\text{Ca}^{++}$  могут быть заменены в среде инкубации на  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$  и  $\text{La}^{+++}$ ; избыток  $\text{Ca}^{++}$  (больше 10—15 мМ) тормозит секрецию, тетродотоксин полностью, а  $\text{Mn}^{++}$ , взаимодействующие с  $\text{Ca}$ -каналом пре-СМ, частично снимают вызванную секрецию ГАМК. Избыток  $\text{Mg}^{++}$  в инкубационной среде также тормозит секрецию  $^3\text{H}$ -ГАМК при калиевой деполяризации срезов коры мозга крыс (Srinivasan et al., 1969) или

синапсом мозга мышей (Cotman et al., 1976). При деполяризации синапсом медиаторные аминокислоты ( $^3\text{H}$ -лизин) не секретируются. Секреция медиаторов синапсами находится в линейной зависимости от величины  $[\text{K}^+]_o$ . Увеличение  $[\text{Ca}^{++}]_o$  с 1 до 5 мМ активирует вызванную секрецию норадреналина, но снижает секрецию ГАМК. Это можно объяснить различием  $\text{Ca}$ -каналов в структуре пре-СМ терминалей, содержащих ГАМК или норадреналин. Интересно, что  $\text{Ca}$ -ионофор А 23187 при инкубации с синапсами в растворе Кребса — Рингера без избытка  $\text{K}^+$  вызывает увеличение секреции ГАМК и норадреналина пропорционально  $[\text{Ca}^{2+}]_o$ . Анализ результатов показал (Cotman et al., 1976), что при калиевой деполяризации синапсом происходит  $\text{Ca}$ -зависимая секреция и  $\text{Ca}$ -независимое высвобождение  $^{14}\text{C}$ -ГАМК. На препарате изолированной сетчатки также показано, что  $\text{Ca}$ -ионофор X 537A вызывает секрецию таурина, ГАМК и глицина, но не влияет на высвобождение лейцина (Pasantes-Mogales et al., 1974). Под действием ионофора выделяется почти столько же таурина, сколько при световой стимуляции сетчатки.

Степень влияния исследуемого ионофора на секрецию медиаторов зависит от присутствия в среде  $\text{Na}^+$ . При малых концентрациях  $\text{KCl}$  (20 мМ) срезами секретируется преимущественно экзогенный глицин, при повышении его концентрации до 40—50 мМ секретируются ГАМК и глутамат (Snyder et al., 1973).

Таким образом,  $\text{Ca}$ -зависимая секреция медиаторных аминокислот указывает на активный экзоцитоз, однако пока не удалось показать, что при длительной деполяризации соответствующих нервных окончаний запас аминокислот в СП истощается.

#### ОБРАТНЫЙ ЗАХВАТ АМИНОКИСЛОТ НЕРВНЫМИ ОКОНЧАНИЯМИ

Инактивация отработанных медиаторных аминокислот в синаптической щели осуществляется системой активного обратного захвата терминалями и частично диффузией в межклеточную среду и дальнейшим активным поглощением нейроглией. В пост-СМ (на ее внешней стороне) нет ферментов, которые расщепляли бы отработанные медиаторные аминокислоты.

Рассмотрим некоторые общие закономерности захвата медиаторных аминокислот, установленные в опытах по включению меченых ГАМК, глутамата, аспартата, глицина, пролина и таурина в срезы или синапсомы головного или спинного мозга животных (Snyder et al., 1973; Curtis, Johnston, 1974).

Отмечается наличие двух систем захвата аминокислот. Захват-1 — это высокоизбирательная и зависящая от температуры система активного переноса медиаторных аминокислот че-

рез пре-СМ против градиента концентрации при высоком сродстве к субстрату ( $K_m = 2-3 \cdot 10^{-5}$  М). Захват-2 — это низкоизбирательная пассивная диффузионная система переноса любых аминокислот, в том числе и медиаторных, через нейрональные и другие мембраны при низком сродстве к субстрату ( $K_m = 2 \cdot 10^{-4} - 3,3 \cdot 10^{-3}$  М), протекающая линейно в течение довольно длительного времени (до 40—60 мин при 30—37 °С) при высоких концентрациях аминокислот ( $10^{-2} - 10^{-4}$  М).

Удаление из среды глюкозы или анаэробные условия значительно снижают скорость активного поглощения аминокислот. Введение в среду АТФ способствует увеличению активного поглощения срезами мозга глицина и других аминокислот. Цианиды, азиды, ДНФ и ингибиторы SH-групп блокируют захват-1. Нарушение структуры пре-СМ терминалей детергентами, фосфолипазой А и жирными кислотами (0,1—0,03 мМ) значительно инактивирует захват-1 (Wegnicke et al., 1975).

Для максимального захвата-1 важно использовать раствор Кребса — Рингера (рН 7,2—7,4). Снижение рН среды уменьшает скорость захвата-1 для ГАМК. Полное блокирование захвата-1 наблюдается при замене  $Na^+$  в среде на катионы триса, холина или Li. Захват-2 практически нечувствителен к изменению  $[Na^+]_o$ . Кинетический анализ показывает, что активный перенос глутамата и глицина через пре-СМ при захвате-1 связан с пассивным переносом  $Na^+$  в отношении 1:1 (Snyder et al., 1973). Снижение  $[Na^+]_o$  уменьшает максимальную скорость захвата, но увеличивает  $K_m$  для аминокислот (Martin, 1973). Кривая зависимости активного транспорта глицина и ГАМК от  $[Na^+]_o$  имеет сигмовидный характер. Для захвата-1 глутамата синапсами спинного мозга крыс оптимум  $[Na^+]_o$  равен 80 мМ, а для глицина — 140 мМ (Bennett et al., 1973). Осмотически разрушенные синапсомы не обладают Na-зависимым связыванием медиаторных аминокислот. При малых значениях  $[Na^+]_o$   $Ca^{++}$  стимулируют захват-1 ГАМК синапсами (Martin, Smith, 1972). Снижение  $[Ca^{++}]_o$  тормозит активное поглощение синапсами или срезами мозга глутамата и ГАМК (Sellström, Hamberger, 1975).

Захват-1 аминокислот значительно блокируется убаином. При снижении величины  $[K^+]_o$  до нуля или увеличении  $[K^+]_o$ , т. е. при калиевой деполяризации, значительно подавляется захват-1 ГАМК и глицина срезами мозга.

Таким образом, захват-1 связан с функционированием Na,K-АТФ-азы. Точнее говоря, связывание экзогенной медиаторной аминокислоты с молекулой-переносчиком и последующий перенос через пре-СМ сопряжен с работой Na,K-насоса. При изучении эффекта различных фармакологических агентов на захват-1 следует учитывать их действие как на Na,K-АТФ-азу, так и непосредственно на гипотетический переносчик (Н. И. Майсов и др., 1976).



При стимуляции электрическим током синапсом захват-1 глутамата, ГАМК и таурина не выявлялся, в то время как захват-2 увеличивался (Lähdesmäki et al., 1975); второй факт соответствует увеличению мембранной проницаемости, а первый — возможно снижению интенсивности работы Na,K-насоса при деполяризации пре-СМ. При калиевой деполяризации синапсом коры мозга захват-1 тормозится для глутамата (Bennett et al., 1973) и неконкурентно для ГАМК (Sellström, Hamberger, 1975). На основании этого сделано предположение о физиологической значимости системы захвата-2 лишь в условиях длительной деполяризации терминалей.

Захват-1 медиаторных аминокислот максимален в тех областях мозга, в которых высокое содержание той или иной аминокислоты. Например, захват-1 глицина максимален в срезах или синапсах спинного мозга, ГАМК — в коре головного мозга; захват-1 ГАМК максимален в дорсальной части промежуточного и среднего мозга, а захват-1 глутамата — в коре головного мозга. Глицин более эффективно захватывается синапсами дорсальных путей спинного мозга, чем вентральных. Как правило, захват в опытах *in vitro* немедиаторных аминокислот не имеет четко выраженного регионального распределения по сравнению с опытами *in vivo* (Levi, Lajtha, 1965). Эти факты указывают, что механизмы переноса аминокислот в мозг через гематоэнцефалический барьер отличны от механизмов их захвата через нейрональные мембраны.

Максимум активности системы захвата-1 аминокислот совпадает в онтогенезе с созреванием синапсов.

Захват-1 характеризует активный транспорт медиаторных аминокислот через пре-СМ соответствующих нервных окончаний. Например, ГАМК при помощи системы захвата-1 переносится из среды только в ГАМК-ергические, но не в другие нервные окончания. Это наиболее отчетливо показано в исследованиях с применением радиоавтографии в сочетании с электронной микроскопией (Neal, Iversen, 1972). Можно предсказывать медиаторную функцию определенной аминокислоты в той структуре нервной системы, где наблюдается захват-1. В опытах с использованием срезов мозга имеет место и захват глиальными клетками, поэтому синапсомы являются наиболее адекватной биохимической моделью исследования системы захвата-1. Любые аминокислоты, переносимые системой захвата-2 в различные популяции синапсом, не образуют связанного фонда и локализуются в терминалях (или клетках), где они быстро расщепляются.

Медиаторные аминокислоты, активно переносимые системой захвата-1 в определенную популяцию синапсом, локализуются в терминалях в связанной форме и сравнительно мало обмениваются со свободными радиоактивными аминокислотами инкубационной среды. Только деполяризация пре-СМ срезов

мозга или синапсом высвобождает медиаторные аминокислоты из связанной формы в среду. По-видимому, в аминокислотергических терминалях, которые содержат большое количество СП, существует динамическое равновесие между свободными медиаторными аминокислотами и связанными в составе СП, причем это равновесие несколько сдвинуто в сторону свободного фонда. Так, по данным Kravitz с соавт. (1965), в тормозящих аксонах омара очень высокая концентрация ГАМК (0,1 М) характерна для свободной формы ГАМК. По мнению Snyder и соавт. (1973), около 90% поглощенных аминокислот составляет связанный фонд в терминалях и лишь 10% подвергаются превращениям в них.

Глиальные клетки также способны активно захватывать медиаторные аминокислоты, например ГАМК, таурин, глицин и глутамат. Так, активный и высокоизбирательный захват-1 ГАМК глией, так же как и синапсосами, является Na-зависимым, но отличается гораздо меньшей скоростью (Iversen, Kelly, 1975; Johnston, Stephanson, 1976). 2,4-Диаминомасляная кислота или нипекотиновая кислота в 10 раз более эффективно ингибирует (неконкурентно) захват-1 ГАМК синапсосами, чем захват-1  $\beta$ -аланина глией. Если ГАМК захватывается преимущественно терминалями, то  $\beta$ -аланин — нейроглией. Высокие концентрации  $\beta$ -аланина не влияют на захват-1 ГАМК терминалями, но тормозят его в глии, в то время как ГАМК конкурентно блокирует захват-1  $\beta$ -аланина. Эти данные указывают на различие в механизме активного переноса ГАМК в нервные окончания и в клетки нейроглии. Функциональная роль глиального активного захвата медиаторных аминокислот состоит в дополнительной инактивации отработанных передатчиков и, кроме того, стимулирует регуляторные отношения в системе нейрон — аксон — нейроглия. Таким образом, оправдывается идея Koelle (1955) о том, что глия обслуживает синапсы, удаляя отработанные медиаторы.

Захват-1 ГАМК срезами или синапсосами мозга неселективно блокируют хлорпромазин и другие фенотиазины, имипрамин, галоперидол, дибутирил-цАМФ. ГАМК-миметики и литики не влияют на захват-1 ГАМК.

Глутамат, аспартат и глицин не влияют на захват ГАМК срезами мозга, ГАМК не влияет на захват-1 глутамата в аксонах омара, но блокирует его в срезах мозга животных. Важное значение для связывания ГАМК с переносчиком пре-СМ имеет наличие как  $\text{NH}_2$ -, так и  $\text{COOH}$ -групп, поскольку ни масляная кислота, ни бутиламин, ни  $\text{NH}_4\text{Cl}$  не являются эффективными ингибиторами захвата-1.

Идеальным обратимым ГАМК-миметиком в ряду производных муцимола считается 3-окси-5-(1-аминоэтил)-изоксазол, а идеальным конкурентным блокатором захвата ГАМК в ряду аналогов муцимола — пиперидин-3-карбоксилат (нипекотино-

вая) кислота ( $I_{50} = 9$  мкМ). Для ГАМК-миметиков аналогов мусцимола расстояние между N...O равно 0,57—0,79 нм, а для ГАМК-блокаторов захвата-1—0,42—0,54 нм. По-видимому, требуется различная стереоконформация ГАМК для связывания с рецептором пост-СМ и для связывания с переносчиком в системе захвата-1 терминалями. Эти данные указывают на различие механизмов связывания ГАМК с рецептором и системы обратного транспорта через пре-СМ (Krogagaard-Larsen, 1975).

Барбитураты потенцируют пре- и постсинаптическое торможение в ЦНС, вызванное ГАМК, способствуя усилению секреции медиатора при стимуляции электрическим током срезов коры мозга крыс и конкурентное торможение захвата-1 (Cutler et al., 1974).

Захват-1 глицина срезами мозга блокируют глутамат, аспартат, ГАМК и аланин. Стрихнин не влияет на активное поглощение глицина. Захват-1 пролина срезами коры мозга не ингибируется глутаматом и аспартатом, в то время как захват-1 дикарбоновых аминокислот блокируется пролином. Активный перенос глутамата в срезы конкурентно блокируется аспаргатом, а захват-1 аспартата в свою очередь тормозится глутаматом. На основании этих данных Snyder и соавт. (1973) сделали вывод, что механизмы захвата-1 для всех трех аминокислот, несмотря на общие черты, различны главным образом благодаря наличию специфических молекул-переносчиков. Конкурентными ингибиторами захвата-1 глутамата синапсосомами коры мозга являются L-цистеат, гомоцестеиновая кислоты,  $\gamma$ -метиловый или этиловый эфир глутамата, L- $\gamma$ -бензил-глутамат.

Известно (Bennett et al., 1973), что метионин-сульфоксид не влияет на захват-1 глутамата синапсосомами коры мозга крыс. Однако другие глутамат-литики, вызывающие судороги, такие, как N-метил-D-аспартат и  $\beta$ -N-оксалил-L- $\alpha,\beta$ -диаминопропионовая кислота, тормозят активное поглощение глутамата и аспартата синапсосомами коры мозга крыс или синапсосомами спинного мозга обезьян (Lakshmanan, Radmanaban, 1974). Эффективность этих реагентов как конвульсантов пропорциональна их влиянию на транспорт возбуждающих медиаторов.

Активный транспорт немедиаторных аминокислот в опытах на синапсосомах или срезах проявляет структурную стереоспецифичность, но, самое главное, в отличие от захвата-1 медиаторных аминокислот не обладает достаточно выраженной региональной зависимостью; характерен для любых нейрональных и глиальных мембран; сопровождается быстрым обменом аминокислот и их вовлечением в биосинтез белка; происходит при низком сродстве к субстрату, соизмеримом с захватом-2 для медиаторных аминокислот; слабо зависит (или совсем не зависит) от изменений  $[Na^+]_o$ ; умеренно блокируется уабайном (Bennett et al., 1973).

## ПОСТСИНАПТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ

Роль ГАМК как медиатора впервые доказана в 1953 г.<sup>1</sup> (Florey, 1953). ГАМК-реактивные структуры в ЦНС локализованы в корзинчатых нейронах морского конька, коре (нисходящие ГАМК-ергические пути из хвостатого ядра и ядер зрительного бугра), в грушевидных невритах, мотонейронах глазодвигательного нерва. В коре головного мозга позвоночных представлены тормозные аксодендритические, а в мозжечке — аксо-соматические синапсы. В дорсальном роге спинного мозга животных ГАМК действует на возбуждающие холинергические вставочные нейроны или на глутаматергические нейроны. Тормозящая природа ГАМК установлена при изучении нервной системы ракообразных (нервное волокно, рецепторы растяжения, сердце, мышцы, кишка), моллюсков и членистоногих. Во всех случаях ГАМК проявляла тормозящее влияние, вызывая гиперполяризацию пост-СМ, сопровождающуюся увеличением проницаемости в основном для  $\text{Cl}^-$  (Grundfest, 1967). Удаление  $\text{Cl}^-$  из инкубационной среды нервно-мышечного препарата ракообразных резко уменьшало тормозящее действие ГАМК. В этих же препаратах выявлена секреция ГАМК при раздражении тормозящих аксонов. Денервация тормозящих аксонов в мышцах беспозвоночных сопровождается потерей чувствительности ГАМК-рецепторов. Действие ГАМК на рецепторы в ЦНС позвоночных не вызывало их десенситизации и было обратимым. В тормозящих аксонах ракообразных содержание ГАМК в 10—100 раз больше, чем в возбуждающих; активность глутаматдекарбоксилазы также больше (на порядок), однако активность аминобутират-аминотрансферазы практически одинаковая. Большие концентрации ГАМК (1—10 мМ) снимают торможение в этих синапсах. Таким образом, ГАМК — универсальный тормозящий медиатор в нервной системе беспозвоночных и один из тормозящих медиаторов в ЦНС позвоночных животных (рис. 27).

Иногда экзогенная ГАМК может оказывать деполяризующее действие на нейроны симпатического ганглия крыс, дорсальных корешков спинного мозга жабы, некоторых зон коры мозга животных, глиальные клетки (Krnjevic et al., 1966). Эти эффекты мало изучены. Предполагается, что ГАМК может имитировать действие ацетилхолина на холинорецепторы, поскольку енольная форма его близка по своей конформации структуре ГАМК.

Для проявления тормозящего действия ГАМК необходимо наличие ее свободных групп — анионной и катионной. Оптимальное расстояние между двумя центрами ГАМК-рецептора

<sup>1</sup> Florey открыл «тормозной фактор I», который впоследствии был идентифицирован с ГАМК.

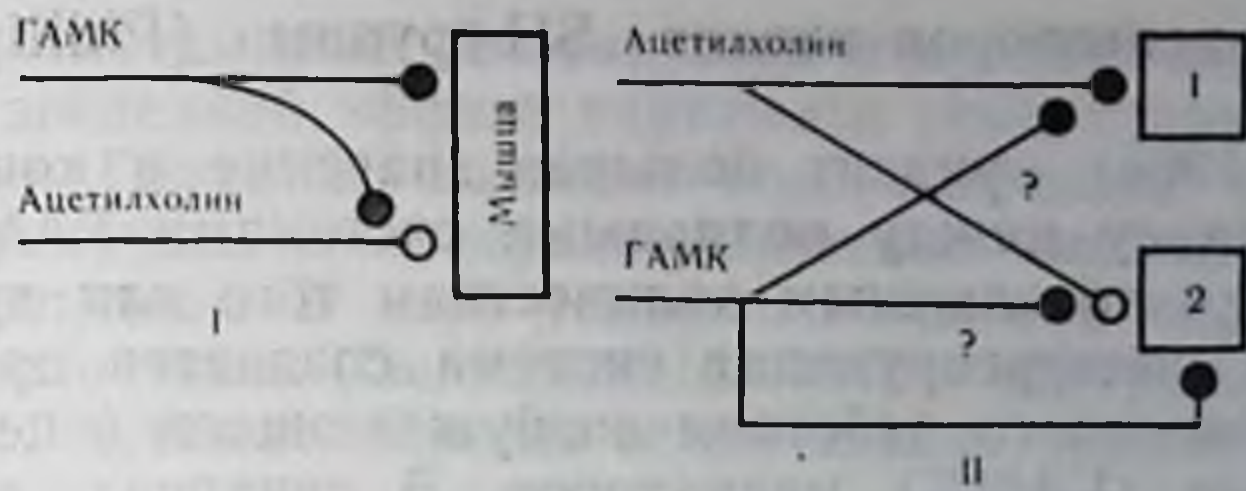


Рис. 27. Синаптические связи ГАМК.

I — нервно-мышечные синапсы ракообразных по Dudel, Kuffler (1961), II — центральные нейроны брюшного ганглия аплазии по Gerschendorf (1973); 1 — Н-нейрон; 2 — Д-нейрон ганглия. Возбуждающие синапсы обозначены светлыми кружками, тормозящие — черными.

равно 0,4 нм, а оптимальным для тормозящего действия является расстояние между двумя группами в структуре ГАМК и его аналогов в 2—3 атома углерода.  $\text{NH}_2$  и  $\text{COOH}$ -группы обязательно должны быть свободными, так как аналоги ГАМК с эфирной или особенно с амидной связью практически не обладают активностью. Центральными миметиками ГАМК являются  $\gamma$ -оксимасляная, 3-амино-1-пропансульфоновая,  $\gamma$ -амино- $\beta$ -оксимасляная,  $\delta$ -аминовалерьяновая и  $\epsilon$ -аминокапроновая кислоты, а также мусцимол. Действие гуанидиновых производных оказалось своеобразным: миметическое в пресинаптическом и литическое в постсинаптическом торможении. Конкурентными и обратимыми ГАМК-литиками являются пикротоксин, бикикулин, коразол, N-замещенные производные ГАМК, бензилпенициллин. ГАМК-рецептор — это интегративный протеолипид мембран; 50% радиоактивности  $^{14}\text{C}$ -ГАМК приходится на ГАМК, прочно связанную с липидами мембран мозга (Proulx, 1966). D-тубокурарин в корковых нейронах проявляет свойства литика ГАМК и глицина (Hill et al., 1972).

Бикикулин конкурентно блокирует связывание меченой ГАМК с изолированным гидрофобным протеолипидным рецептором мышц креветок (de Robertis, 1976). Данный рецептор (отн. мол. м.  $32 \cdot 10^4$ ) не связывает меченый глутамат. Очищенный ГАМК-рецептор мозжечка крыс является гликопротеидом; он чувствителен к бикикулину, но не к пикротоксину (Pesch et al., 1975). Связывание  $^{14}\text{C}$ -ГАМК синаптическими мембранами коры мозга крыс при 0—4°C блокируется бикикулином и хлорпромазином. Действие хлорпромазина можно объяснить тем, что связывание представляет собой суммарный процесс сорбции ГАМК с белком-рецептором пост-СМ и частично с белком пре-СМ, участвующим в механизме обратного захвата, а последний процесс чувствителен к хлорпромазину.

Если поглощение ГАМК синапсосомами  $\text{Na}$ -зависимое, то связывание  $^3\text{H}$ -ГАМК синаптическими мембранами является  $\text{Na}$ -независимым процессом (Enna et al., 1975). В активный

центр ГАМК-рецепторов входят SH-группы (Phillips, Kelly, 1975).

Roberts (1966) придает большее значение в конвергенции синапсов балансу между полярными системами ГАМК и ацетилхолина, чем абсолютным количествам того или другого медиатора. Эта конвергирующая система создается при условии взаимообусловленного действия возбуждающего (ацетилхолин) и тормозящего (ГАМК) медиаторов. В синапсах, по мнению Roberts, существует постоянный основной уровень свободной ГАМК, а не ацетилхолина, поскольку  $K_m$  для субстрата и активность аминобутират-аминотрансферазы значительно ниже, чем для ацетилхолинэстеразы. Избыток ГАМК прямо или косвенно может оказывать влияние как репрессор образования мРНК, участвующей в синтезе ферментов, катализирующих образование ГАМК, или как депрессор образования мРНК в целях синтеза ферментов, участвующих в разрушении ГАМК. Известно, что ацетилхолин способен тормозить аминобутират-аминотрансферазу, а ГАМК ингибирует ацетилхолинэстеразу. Согласно гипотезе Roberts (1966), ацетилхолин и ГАМК не присутствуют одновременно в одном и том же синапсе, но ацетилхолин может через обратную связь регулировать секрецию ГАМК, а ГАМК в свою очередь — секрецию ацетилхолина.

Ионофоретическое введение глицина в спинальные мотонейроны, интернейроны и крестцовые парасимпатические нейроны, а также в нейроны сетчатого образования ствола мозга оказывает на них сильное тормозящее действие, связанное с гиперполяризацией пост-СМ и увеличением проницаемости для  $Cl^-$ . Внутриклеточное введение  $Cl^-$  извращает ТПСР.

Литиками глицина являются стрихнин, бруцин, тебаин, дендробин, диаболин, морфин, гелземин, лаудонозин, а также синтетические реагенты: N,N-диметилмусцимол, леворфанол, N-метилбикукулеин; 4-фенил-4-формил-N-метилпиперидин. Действие стрихнина обратимое и конкурентное. Миметиками глицина являются  $\beta$ -аланин, таурин, пролин. Литики ГАМК и глицина способны вызывать судороги.

Литиками глутамата в нейронах сетчатки, зрительного бугра, подбугорной области, дорсальных путей спинного мозга являются D,L- $\alpha$ -метилглутамат, диэтиловый эфир D-глутамата, L-метионин-сульфоксимид, 1-окси-3-аминопирролидон-2, диэтиловый эфир лизергиновой кислоты, 2-метоксиапорфин. Миметики глутамата — это транквилизатор талидомид, L-аспартат, D-гомоцистеиновая кислота, N-метил-D-аспартат,  $\beta$ -N-оксалил-L- $\alpha,\beta$ -диаминопропионат. Последние три реагента более эффективны, чем глутамат и аспартат. D-глутамат менее эффективен, чем L-глутамат. Постсинаптический эффект глутамата связан с увеличением проницаемости пост-СМ для  $K^+$ . С другой стороны, глутамат (как и аспартат) является деполяризующим агентом для пре-СМ, причем усиление пассивного транспорта  $Na^+$ ,

вызванное глутаматом, блокируется тетродотоксином. Оспорован ли последний эффект глутамата рецептором пре-СМ, пока не ясно. Глутамат является возбуждающим медиатором в ЦНС позвоночных и в нервно-мышечных синапсах ракообразных и насекомых. В коре головного мозга и нервной системе кишечного-полостных (Gerschenfeld, 1973) обнаружены нейроны, в которых глутамат, помимо возбуждения, вызывает торможение.

При помощи органических растворителей de Robertis (1975) выделил из мышц креветок и насекомых гидрофобный протеолипид, избирательно связывающий глутамат. Гидрофобные рецепторные белки для ГАМК и глутамата выделены также из коры мозга, а для глицина — из спинного мозга. Связывание глутамата подавляется соответствующими антагонистами. Связывание  $^{14}\text{C}$ -глутамата синаптическими мембранами происходит в две фазы: низкоизбирательно ( $K_{\text{дисс}}=4,4 \text{ мкМ}$ ) и высокоизбирательно с насыщением ( $K_{\text{дисс}}=0,2 \text{ мкМ}$ ). Вторая система связывания обратима, стереоспецифична и обладает максимумом при рН 8,0 в присутствии  $0,5 \text{ мМ Ca}^{++}$ , блокируется ГАМК. Рецептор сольбилизируется из мембран при обработке детергентами. Связывание глутамата инактивируется  $\beta$ -глюкуронидазой, фосфолипазой или протеазами. Показано (Michaelis, 1975), что рецептор для глутамата является кислым гликопротеидом (отн. мол. м.  $138 \cdot 10^2$ ).

На синаптических мембранах мозга коры Roberts (1975) показал также наличие двух форм связывания  $^{14}\text{C}$ -глутамата с  $K_{\text{дисс}}=4 \cdot 10^{-6} \text{ М}$  (связывание с молекулой переносчика в пре-СМ при захвате глутамата терминалями) и с  $K_{\text{дисс}}=8,3 \cdot 10^{-7} \text{ М}$  (связывание с рецептором пост-СМ). В лишенной натрия среде обнаружен только второй тип связывания. Этот процесс блокировали соответствующие антагонисты.

Глутаминовая и другие кислые аминокислоты обладают способностью высвободить некоторую часть  $\text{Ca}$ , связанного с синаптическими мембранами мозга морских свинок. Нейтральные и щелочные аминокислоты, в том числе глутамин, глицин и ГАМК, такой способностью не обладают (Tap, 1975).

Связывание меченого стрихнина синаптическими мембранами спинного, продолговатого и среднего мозга крыс конкурентно блокируется глицином и  $\beta$ -аланином. Анионы хлора неконкурентно и аллостерически ингибируют связывание стрихнина синаптическими мембранами спинного мозга крыс. На основании того, что глицин способен вытеснять связанные стрихниновым рецептором анионы, сделано предположение, что связывание стрихнина со своим рецептором ассоциировано с изменением проводимости  $\text{Cl}^-$  в глициновом рецепторе (Young, Shydeg, 1974). Во вставочных нейронах предполагается существование двух типов глициновых рецепторов — чувствительных и нечувствительных к стрихнину. Последний тип рецепторов гли-

цина в некоторых случаях связан с появлением ВПСР и увеличением проницаемости пост-СМ для  $\text{Na}^+$  (Evans et al., 1976). Связывание  $^{14}\text{C}$ -глицина с синаптическими мембранами коры мозга крыс обратимо, блокируется стрихнином, зависит от температуры и аллостерически от  $[\text{Na}^+]_o$ , происходит при  $37^\circ\text{C}$  с высоким сродством к глицину ( $K_M=40$  мкМ) и с низким сродством к глицину ( $K_M=500$  мкМ) (Valdes, Orrego, 1975). При снижении  $[\text{Na}^+]_o$  резко уменьшается скорость связывания второго типа, имеющего отношение к системе захвата глицина терминалями, в то время как скорость связывания первого типа при некотором увеличении значения  $K_M$  не меняется.

Сопряжено ли постсинаптическое действие медиаторных аминокислот с системой циклических нуклеотидов, пока не ясно. Известно, что инкубация срезов мозга морской свинки (Shimizu et al., 1974) или мозжечка мышей (Feggenelli, 1974) с глутаматом резко увеличивает содержание цАМФ в этих тканях, а теофиллин в обоих случаях блокирует эффект. Показано, что глутамат в 10 раз увеличивает содержание цАМФ и цГМФ, глицин — на 50% содержание цАМФ, ГАМК уменьшает содержание цАМФ. Совместная инкубация срезов с ГАМК и глицином увеличивает количество цГМФ в 2—3 раза. Все эффекты резко снижаются или исчезают в лишенной Са среде. Глутамат не потенцирует эффект калиевой деполяризации, при которой секреторирующиеся медиаторы стимулируют синтез цАМФ и цГМФ в постсинаптических нейронах. При инкубации срезов новой коры мозга морской свинки глутамат увеличивает содержание цАМФ в ткани, в то время как ГАМК дает слабый эффект. Очевидно, глутамат, стимулируя, как и электрический ток, секрецию срезами адениловых производных, в этом случае действует на пре-СМ (Pull, McIlwain, 1975). После нанесения на поверхность мозжечка крыс ГАМК или глицина содержание цАМФ по иммуноцитохимическим данным (Siggins et al., 1973) не изменяется. Ранее было показано (Kakiuchi, Rall, 1968), что ГАМК не влияет на активность АДЦ-азы мозга кроликов.



## 14. Биохимия пептид-, пурин- и гистаминергических нейронов

---

### ПЕПТИДЕРГИЧЕСКИЕ НЕЙРОНЫ

Нейроны, которые секретируют пептиды нервными окончаниями, называют пептидергическими (Baggman et al., 1967); в случае иннервации эффекторных клеток можно говорить о пептидергических синапсах. Например, нейросекреторные (точнее, пептидергические) нейроны подбугорной области, надзрительные и околожелудочные ядра образуют аксональные контакты на клетках промежуточной и задней долей нейрогипофиза, секретируя соответственно октапептиды вазопрессин и окситоцин. Эти нейрогормоны могут поступать далее в кровоток, при этом вазопрессин действует на сосуды и почки, а окситоцин — на матку. Нейроны подбугорной области также могут иннервировать железистые клетки аденогипофиза, при этом нервными окончаниями секретируются так называемые релизинг-факторы (полипептиды, которые стимулируют выделение гормонов гипофиза). Са-зависимый выброс релизинг-факторов в среду можно наблюдать *in vitro* при стимуляции электрическим током синапсом подбугорной области (Bradford et al., 1972). Таким образом, гипофиз вместе с воротной системой сосудов является депо многочисленных гормонов. Пептидергичес-

кие нейроны распространены не только у позвоночных, но и у беспозвоночных, однако биохимия пептидергических синапсов изучена плохо (А. Л. Поленов, 1971). Нервные окончания пептидергических нейронов подбугорной области содержат электроплотные секреторные гранулы диаметром 190—230 нм. В секреторных гранулах хранятся вазопрессин или окситоцин в комплексе с АТФ и растворимыми кислыми липопротеидами — нейрофизинами (Poisner, Douglas, 1968). Окситоцин связан с нейрофизинном I, а вазопрессин — с нейрофизинном II. При деполяризации медиаторы секретуются вместе с нейрофизинами (Nordmann et al., 1971). Нейрофизины не обладают биологической активностью, богаты цистином и специфически окрашиваются в гранулах некоторыми красителями (хромовый гематоксилин, комплекс паральдегидфуксин). В процессе секреции в нервных окончаниях происходит накопление мелких светлых гранул, представляющих собой остатки больших плотных секреторных гранул после экзоцитоза.

В опытах с выделением синаптосом (секретосом) и секреторных гранул из нейрогипофиза было показано, что 50—80% вазопрессина и окситоцина локализовано в гранулах, т. е. своего рода СП. Стимуляция электрическим током или калиевая деполяризация срезов нейрогипофиза животных приводила к Са-зависимой секреции нейрогормонов (Rubin, 1970). Вызванная секреция ингибируется снижением  $[Na^+]_o$ , увеличением  $[Mg^{++}]_o$ . Высокие концентрации  $Ca^{++}$  (больше 4 мМ) также угнетают секрецию этих гормонов. Спонтанная секреция вазопрессина зависит от наличия  $Ca^{++}$  в среде, увеличение  $[Ca^{++}]_o$  или добавление  $Ba^{++}$  усиливает спонтанный выброс. Секреция окситоцина и вазопрессина индуцируется убаином, ингибиторами тиоловых групп и снижением температуры. В двух последних случаях выброс гормонов из нейрогипофиза может происходить и в отсутствие  $Ca^{++}$ . Синаптосомы, выделенные при 20°C из гипоталамус-гипофизарного тракта, отвечают на снижение температуры резким выбросом вазопрессина и нейрофизина II (Vaker, Nore, 1976). Эффект «холодовой» стимуляции секреции пока не ясен.

Секреция нейрогормонов зависит от поступления  $Ca^{++}$  в нервные окончания при их стимуляции.

В условиях *in vitro* определенные концентрации  $Ca^{++}$  тормозят образование комплекса вазопрессина или окситоцина с соответствующим нейрофизинном (Ginsburg et al., 1966), при этом  $Mg^{++}$  и  $Na^+$  не влияют на процесс связывания. Инкубация секреторных гранул нейрогипофиза с  $Ca^{++}$  или, что более эффективно, с комплексом  $Ca^{++}$  и АТФ (Poisner, Douglas, 1968) индуцирует высвобождение вазопрессина, причем ингибиторы АТФ-азы блокируют этот процесс.

Рецептором вазопрессина и окситоцина в эффекторных клетках (в некоторых случаях в пост-СМ) является регуляторная

субъединица АДЦ-азы. Вазопрессин может конкурировать с норадреналином через  $\alpha$ -адренорецепторы при активации АДЦ-азы (Watlington, 1969). Изменения ионной проницаемости в срезах мозга, вызванные вазопрессином, снимаются ганглиозидами (Dawson, Bone, 1966).

**Ангиотензин и брадикинин.** В плазме крови имеются активные полипептиды — брадикинин (нонапептид, оказывающий гипотензивное действие) и его аналоги: каллидин, физалаемин и эледонзин, а также ангиотензин II (октапептид гипертензивного действия). Ангиотензин II образуется из биологически неактивного декапептида ангиотензина I под действием ренина (А. М. Чернух и др., 1975).

Известны некоторые эффекты этих активных полипептидов в регуляции механизмов синаптической передачи и кругооборота медиаторов в ЦНС. Рениноподобная активность обнаружена в синапсосомах подбугорной области, мозжечка, полосатого тела и ствола мозга (Minnich et al., 1972). Функции ангиотензинов в нервных окончаниях неизвестны. Биологические эффекты указанных активных полипептидов опосредуются через систему циклических нуклеотидов. Ангиотензин II вызывает в опытах *in vivo* секрецию ацетилхолина и норадреналина корой мозга, периферическими нервами и надпочечниками (для катехоламинов) животных, а в опытах *in vitro* — секрецию вазопрессина изолированным нейрогипофизом крыс. В нервно-мышечных синапсах некоторых гладких мышц активные полипептиды гастрин, церулин и др. также потенцируют секрецию ацетилхолина, вероятно, за счет инактивации Na,K-АТФ-азы (Vizi et al., 1972). Получены доказательства, что ангиотензин вызывает в мозге и сердце торможение активного захвата норадреналина в терминали; этим объясняется его накопление в межклеточной жидкости при стимуляции. Если принять во внимание эти данные, то становится понятным (см. главу 11), почему ангиотензин II в условиях повышения содержания норадреналина в межклеточной среде активизирует биосинтез этого медиатора в терминалях (Davilla, Khaigallah, 1972). Действие брадикинина на процессы обмена в ЦНС практически не изучено.

Можно полагать, что рассмотренные активные полипептиды способны выполнять функцию модуляторов синаптической передачи.

**Полипептид Р.** Этот активный нейроспецифический полипептид, открытый еще в 1930 г., состоит из 11 аминокислот (отн. мол. м.  $14 \cdot 10^2$ ). В мозге животных он локализован преимущественно в черной субстанции (1500 мкг на 1 г ткани), подбугорной области, сером веществе головного мозга, сенсорных нейронах дорсальных корешков спинного мозга и желатинозной субстанции; отсутствует в нейроглии. После субклеточного функционирования ткани максимальное содержание полипеп-

тида Р обнаруживается в синапсосомах (Duffy et al., 1975), а именно в СП (Kataoka, 1962). В микросомах мозга содержатся протеазы, инактивирующие этот полипептид. Исходя из этого, можно полагать, что полипептид Р каким-то образом высвобождается в синаптическую щель при возбуждении, где он может оказывать модулирующее постсинаптическое действие.

Известно, что полипептид Р деполяризует спинальные мотонейроны. Эффективность полипептида Р, физалаемина и элдонина, имеющих одинаковые N-концевые аминокислоты, во много раз превышает эффективность L-глутамата. Указанные полипептиды вызывают деполяризацию путем прямого действия на мотонейроны, так как эффект сохраняется и после блокады нервных окончаний в бескальциевой среде Рингера или после добавления тетродотоксина. Брадикинин и ангиотензин II также обладают деполяризующим действием, хотя и менее выраженным, чем полипептид Р, на мотонейроны спинного мозга (Konishi, Otsuka, 1974) и нейроны коры головного мозга (Phillips, Limacher, 1974). Периферическая сенсорная стимуляция вызывает секрецию полипептида Р. Сам полипептид способен вызывать секрецию ацетилхолина в коре мозга (Zetler, 1970). Полипептид Р увеличивает содержание свободного глицина в мозге мышей, при этом стрихнин тормозит его действие (Stegm et al., 1974). Возможным рецептором для полипептида Р в эффекторных нейронах является АДЦ-аза. Активный полипептид Р является скорее всего не медиатором, а модулятором синаптической передачи.

В 1973 г. было обнаружено, что подбугорная область секретирует морфинподобные полипептиды, содержащие 5—30 аминокислот, которые, взаимодействуя с рецептором эффекторных клеток, тормозят передачу болевых сигналов (Snyder, Siantov, 1977).

## ПУРИНЕРГИЧЕСКИЕ СИНАПСЫ

Burnstock (1971, 1972) предположил наличие в гладких мышцах желудочно-кишечного тракта позвоночных, а также в гладких мышцах легкого и мочевого пузыря (возможно, и в сетчатке) особых пуринергических синапсов, в которых медиатором являются АТФ или ее производные. Пуринергические нервные окончания, иннервируя мышцы желудочно-кишечного тракта, оказывают тормозящее, гиперполяризующее действие, регулируя релаксацию мышц. В этом случае ацетилхолин является возбуждающим, а норадреналин — тормозящим медиатором. Данные пуринергические нервные окончания в отличие от холин- или норадреналинергических терминалей содержали крупные гранулярные СП (100—200 нм). Если большие гранулярные СП пуринергических терминалей под наружной цитомем-

браной имеют прозрачную зону, а остальная часть занята электронно-плотным содержимым, то в больших гранулярных СП пуринаргических терминалей плотное содержание заполняет всю гранулу. 6-Оксидофамин не опустошает запасы медиаторов в этих гранулах. При раздражении соответствующих тормозящих нервов в перфузате накапливаются АТФ и продукты ее гидролиза (аденозин, инозин), в то же время в перфузате можно обнаружить ряд веществ, которые могут играть роль медиаторов или модуляторов постсинаптического действия: серотонин, цАМФ, гистамин, простагландины, аминокислоты и полипептиды. По данным Burnstok (1972), только пуриновые нуклеотиды (АТФ, АДФ, частично АМФ и аденозин) являются наиболее эффективными ингибиторами моторики кишечной мышцы. После инкубации тканей желудочно-кишечного тракта с <sup>3</sup>H-аденозином радиоактивность преимущественно обнаруживается в АТФ и частично в АМФ и инозине. Большая часть меченой АТФ обнаруживается в нервах, а не в мышцах.

При стимуляции электрическим током тормозящих пурин- и норадреналинергических нервов наблюдается секреция меченых адениловых производных обоими нервными окончаниями, однако гуанетидин блокирует секрецию норадреналина и нуклеотидов адренергическими нервами, не затрагивая пуринаргические. На фоне гуанетидина тетродотоксин блокирует и процесс секреции нуклеотидов пуринаргическими нервами. Секретируемый АТФ в синаптической щели расщепляется Mg-АТФ-азой до АДФ, который далее распадается до АМФ. 5'-Нуклеотидаза пре-СМ или гладких мышц расщепляет АМФ до аденозина, который частично может дезаминироваться до инозина. Аденозин после постсинаптического действия нуклеотидов активно захватывается терминалями, где участвует в ресинтезе АТФ. Ингибиторами обратного захвата аденозина являются дипиридамола, папаверин и лидофлазин. Предполагается, что существуют два типа рецепторов пост-СМ мышц для аденозина (или АТФ): рецептор Q, для которого литиками являются хинин, хинидин и мепакрин, и рецептор P, для которого литиками являются фенотиазин и дибензазепин. Первый тип рецепторов в гладких мышцах желудочно-кишечного тракта млекопитающих регулирует образование ТПСР и релаксацию мышц, а в тех же мышцах низших позвоночных и мочевом пузыре млекопитающих регулирует образование ВПСР и сокращение мышц. Второй тип рецепторов в гладких мышцах матки в отличие от первого типа регулирует сокращение мышц. Тормозящее медиаторное действие АТФ или аденозина предполагается и в мозге (Ginsburg, Hirst, 1971). Возможным рецептором пост-СМ пуринаргических синапсов является АДЦ-аза (ее регуляторная субъединица). В этом случае легко объяснить пуриномиметическое действие АТФ, АДФ, аденозина и АМФ и литическое действие ингибиторов ФДЭ.

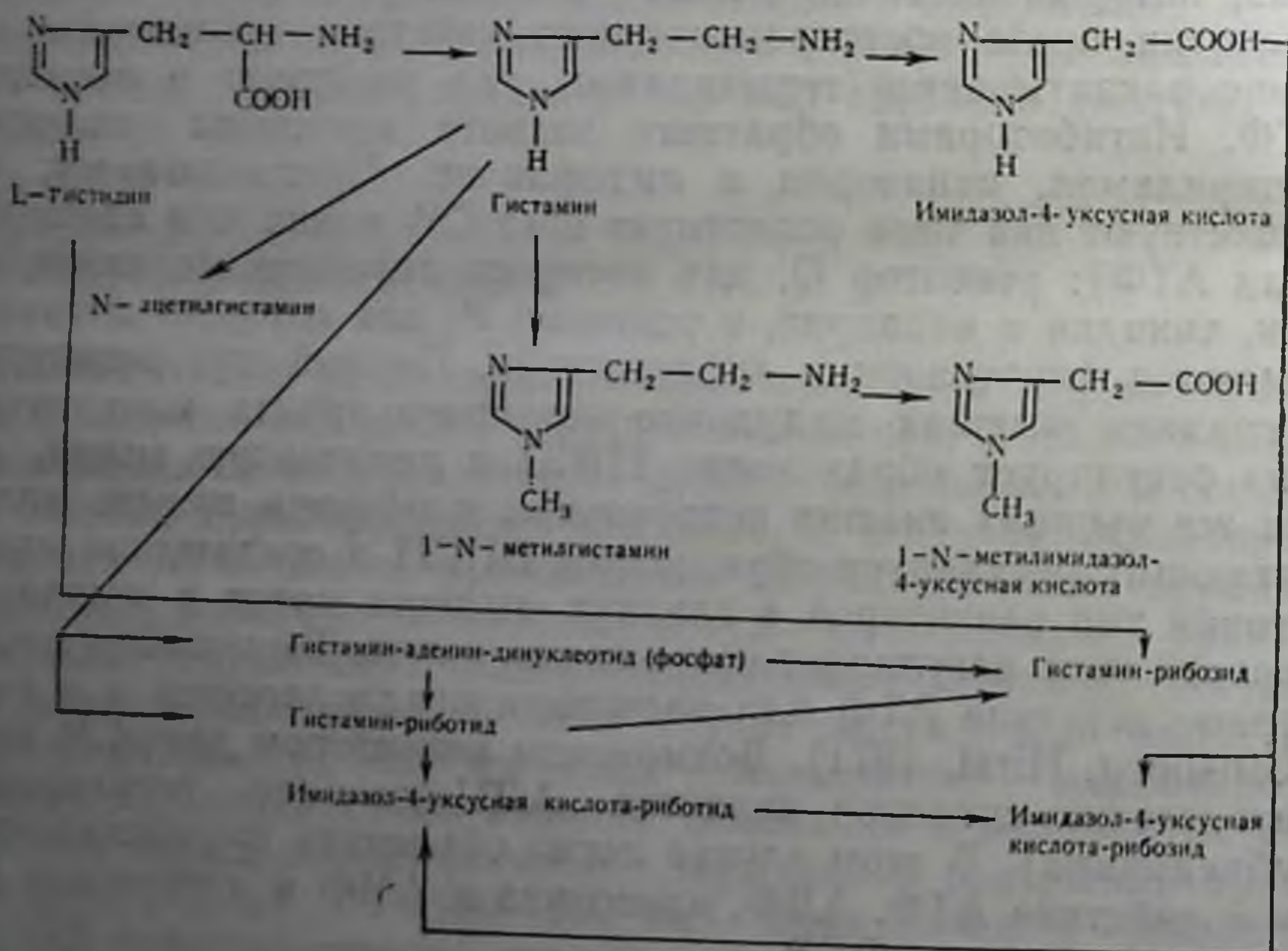
Существование пуринергических синапсов признается не всеми (Heazell, 1975). Описано действие адениловых нуклеотидов и аденозина на процессы сокращения и расслабления сердца, однако наличие особых пуринергических синапсов не предполагается.

## ГИСТАМИН

Этот биогенный амин содержится в периферических нервах и ЦНС. Высокое содержание гистамина обнаружено (см. табл. 13) в подбугорной области, зрительном нерве, невротиках гипофиза и эпифиза и чувствительных нервах спинного мозга. В периферической нервной системе гистамин локализован в сенсорных нервных волокнах роговицы глаза и кожи; в последних возбуждающее действие гистамина регулирует болевую чувствительность. Особенно много гистамина в постганглионарных симпатических волокнах селезенки и блуждающего нерва (до 100 мкг на 1 г нерва). В чувствительных нервах гистамина больше, чем в двигательных. Гистамин не проникает через гематоэнцефалический барьер, и синтез его осуществляется в нервной ткани (схема 13).

Схема 13

### Обмен гистамина в нервной ткани



Предшественником гистамина является гистидин. Гистидиндекарбоксилаза отлична от декарбоксилаз ароматических кислот по отношению к ингибиторам. Величина  $K_m$  для гистидина превышает уровень этой аминокислоты в ткани. Отсюда следует, что синтез гистамина при высоком содержании гистидина может увеличиваться. В периферических нервах среди метаболитов гистамина обнаруживаются ацетилгистамин и 2-метилгистамин. Наиболее высокая активность гистидиндекарбоксилазы отмечается в подбугорной области. По-видимому, нейроглия способна накапливать гистамин. Ингибиторы МАО увеличивают содержание 1-N-метилгистамина в мозге. Из производных гистамина биологической активностью обладает имидазол-4-уксусная кислота. У лангуста этот метаболит проявляет свойства тормозящего медиатора в большей степени, чем ГАМК. Внутривентрикулярное введение мышам имидазол-4-уксусной кислоты оказывает снотворное действие. Не является ли метилирование возбуждающего медиатора гистамина способом не только его инактивации, но и трансформации в тормозящий медиатор? Распределение в мозге гистамина сходно с распределением МАО и гистамин-N-метилтрансферазы.

При субклеточном фракционировании мозга животных установлена преимущественная локализация гистамина в синаптосомах коры и подбугорной области (Kuhar et al., 1971). В коре мозга крыс гистамин локализован в малых синаптосомах и депонирован в СП (Kataoka, de Robertis, 1967). Малые синаптосомы при центрифугировании входят также во фракцию микросом. Максимум активности гистидиндекарбоксилазы обнаружен также в синаптосомах морского конька, причем фермент является растворимым и находится в цитоплазме нервных окончаний (Vaudry et al., 1973). В синаптосомах подбугорной области локализована гистамин-N-метилтрансфераза, а N-метилгистамин обнаружен также в синаптосомах.

При стимуляции электрическим током переднего отдела подбугорной области кролика наблюдается секреция эндогенного гистамина. Стимуляция током или калиевая деполяризация срезов мозга крыс или мышей также сопровождается секрецией гистамина. При калиевой деполяризации срезов подбугорной области мозга крыс, которым введен  $^3\text{H}$ -гистидин, выявляется Са-зависимая секреция экзогенного  $^3\text{H}$ -гистамина, а секреция  $^3\text{H}$ -гистидина не обнаруживается (Taylor, Snyder, 1973). В этих условиях тетродотоксин не влиял на высвобождение гистамина. Высвобождение вызывали теofilлин и резерпин. Резерпин может замещать гистамин в СП, который затем диффундирует из нервных окончаний в инкубационную среду. Фентоламин и феноксibenзамин в концентрации 0,1 мМ блокировали спонтанную и вызванную резерпином или теofilлином секрецию гистамина. Калиевая деполяризация приводит также к увеличению синтеза  $^3\text{H}$ -гистамина в срезах подбугорной области мозга

крыс (Verdiere et al., 1974). При стимуляции электрическим током седалищного, блуждающего и френико-диафрагмального нервов кроликов, кошек и крыс обнаружено высвобождение эндогенного гистамина, снижение активности диаминооксидазы (гистаминазы) и, что очень важно, увеличение активности гистидиндекарбоксилазы (И. Л. Вайсфельд, 1970). Выявлена еще одна важная особенность: большие концентрации гистамина в инкубационной среде вызывают торможение собственного процесса секреции. При перфузии гистамином верхнего шейного ганглия кошек отмечается его возбуждающее действие, как и ацетилхолина. Более того, ганглий, утративший способность реагировать возбуждением на введение ацетилхолина, сохраняет ее в ответ на введение гистамина.

Са-зависимый механизм секреции гистамина установлен и в других секреторных клетках: лейкоцитах, тромбоцитах, лаброцитах и в легочной ткани. Как и следовало ожидать,  $Ca^{++}$  могут быть заменены  $Sr^{++}$ , избыток внеклеточного  $Mg^{++}$  тормозит секрецию, АТФ ускоряет ее, а одновременное блокирование гликолиза и окислительного фосфорилирования тормозит в указанных тканях секрецию гистамина (Rubin, 1970). Гистаминомиметической активностью обладает 4-(2-аминоэтил)-имидазол. Имидазольное кольцо и  $NH_2$ -группа гистамина находятся в трансположении по отношению к углеродной связи этильной группы. Гистаминолитическими (антигистаминовыми) препаратами являются производные этиламина и фенотиазина. Различают два типа гистаминовых рецепторов:  $H_1$ -рецепторы в кровеносных сосудах, от которых зависит увеличение проницаемости мембран и литическим действием на которые обладает хлорфениламин, и  $H_2$ -рецепторы в цитоплазматических мембранах базофилоцитов и в ЦНС, при функционировании которых увеличивается активность АДЦ-азы, литическим действием на которые обладает трипеленамин. Предполагается, что  $NH$ -группы имидазольного кольца гистамина связываются с карбонильной группой рецептора, а водород боковой цепи гистамина — с пиридиновым азотом имидазольного кольца рецептора. Взаимодействие гистамина с рецептором приводит также к значительному увеличению содержания цАМФ в срезах новой коры морских свинок (Pull, McIlwain, 1975), причем кофактором активации АДЦ-азы является аденозин. Представленные данные указывают на возможную функцию гистамина как нейромедиатора. Гистамин играет также важную роль в патогенезе аллергии, воспаления и болевых синдромов, контролирует в ЦНС цикл сна и бодрствования, потребление воды. Гистамин вызывает секрецию некоторых рилизинг-факторов подбугорной области, которые в свою очередь участвуют в секреции тропных гормонов гипофиза. После постсинаптического действия гистамина инактивируется гистамин-N-метилтрансферазой.



## Заключение

---

В книге сделана попытка интегрально и схематически представить узловые моменты и основные механизмы осуществления главной функции синапсов — проведения возбуждения от клетки к клетке. Эти механизмы имеют универсальный характер, так как присущи всем химическим синапсам. Описывая их, мы старались отметить и нерешенные вопросы, представляющие задачу для будущих исследований.

Пришедший по аксону импульс деполяризует нервное окончание — возникает сопряженный процесс торможения мембранного катионного насоса. Этот процесс влечет за собой цепь реакций, из которых главными являются: увеличение пассивного транспорта  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , формирование ион-селективных каналов, в том числе  $\text{Ca}$ -канала, остановка захвата терминалями медиаторов из синаптической щели, структурные перестройки мембран нервных окончаний, которые могут способствовать формированию комплементарных участков на пре-СМ, способных контактировать с СП. Взаимосвязь и последовательность указанных процессов все еще требуют детального анализа.

Поступление в терминали  $\text{Ca}^{++}$  при ее деполяризации является условием активации секреции медиаторов. Те СП, которые находятся вблизи активной зоны пре-СМ, взаимодействуют при участии  $\text{Ca}^{++}$  с комплементарными участками мембраны, образуя актомиозиновый

комплекс. В результате сокращения этого комплекса происходит выброс медиаторов и их спутников в синаптическую щель. Поэтому выброс медиаторов имеет квантовый характер. На этом этапе не ясен процесс мобилизации СП, т. е. движения СП на активные позиции. Контрактильная гипотеза экзоцитоза медиаторов также требует новых доказательств, в частности должна быть доказана универсальность этого механизма.

Для ацетилхолина и норадреналина выяснено, что комплекс кислых белков (везикулин и хромогранин) и АТФ являются матрицей связывания медиаторов внутри СП. Матрица (везикулярный рецептор для медиаторов) может образовывать комплекс в жидкой фазе СП или на внутренней поверхности их мембраны. Пока не ясно, секретировается ли при контакте СП с пре-СМ порция (квант) медиаторов, состоящая в комплексе со свободной матрицей (жидкая фаза СП), или с матрицей, фиксированной на мембране СП. Выяснение этого вопроса может облегчить понимание экзоцитоза. Не ясно также, как восполняются запасы АТФ и кислых белков в терминали. Ответ на этот вопрос важен для разрешения другой задачи: используются ли СП многократно в синаптической передаче или они «приносят себя в жертву» ради выброса одного кванта медиатора и его спутников.

Судьба и назначение кислых белков, секретироваемых в синаптическую щель, не ясна. В литературе обсуждается функция этих белков как переносчиков медиаторов через мембраны. Возможно, некоторые из них играют роль переносчиков, другие выполняют функцию трофогенов или коннекторов — «проторителей» синаптических путей.

Следует упомянуть, что некоторые нейроспецифические белки, например белок S-100, способны высвобождаться в синаптическую щель.

Секретируемый медиатор диффундирует в синаптической щели к пост-СМ и взаимодействует с рецептором, в результате чего возникает де- или гиперполяризация пост-СМ. Весьма важно обратить внимание на то, что эти процессы играют также роль триггерного механизма изменения обмена постсинаптической клетки, который начинает осуществляться по новой генетической программе. В изменении метаболической программы ведущую роль играет система цАМФ и цГМФ. Изменение программы работы постсинаптического нейрона может привести к ресинтезу в его полисомах нового рецепторного белка или к угнетению действия протеаз, разрушивших этот белок. В результате встраивания данного белка в нейрональные мембраны появляются новые рецепторы, обеспечивающие возможность дальнейшей, более усиленной или заново возникающей активации нейрона. Такая ситуация может иметь важное значение при обучении и при других формах деятельности нервной системы в норме и патологии.

Отработанные медиаторы инактивируются в синаптической щели главным образом благодаря системе активного захвата. Этот процесс сопряжен с функционированием Na,K-насоса. Отсюда следует, что обратный захват по времени после экзоцитолиза сопряжен с моментом реполяризации мембран нервных окончаний, при которой Na,K-насос реактивируется. Временная последовательность указанных процессов определяется сложными и не совсем ясными обратными связями между терминалями и постсинаптической клеткой.

В ходе реполяризации мембран терминалей происходит активное выведение  $Ca^{++}$  во внеклеточную среду, в результате чего расслабляется комплекс актомиозина, СП отделяются от пре-СМ, по-видимому, становятся готовыми для пополнения запасов медиатора и секреции.

Медиатор, перенесенный обратно в терминали при помощи системы активного захвата, аккумулируется везикулами и депонируется в них.

В этой части проблемы возникает ряд существенных вопросов. Нужно решить, является ли квантово-везикулярное выделение единственным и универсальным для всех медиаторов видом секреции, не существует ли других способов выделения медиаторов; как осуществляется «утечка» медиаторов в условиях патологии; идентичны ли механизмы секреции в нормальных условиях с теми, которые имеют место при деполяризации синапсом *in vitro*; связаны ли механизмы секреции медиаторов с природой последнего или они едины для всех передатчиков.

В ходе деполяризации мембран нервных окончаний наряду с потерей запасов медиаторов происходит включение системы их ресинтеза. Истощение запасов некоторых компонентов нервных окончаний в ходе обмена восполняется аксотоком макромолекул и органелл из тела нейронов. Не исключена также возможность локального синтеза некоторых функционально-значимых белков в нервных окончаниях, например тропонинподобного белка.

Взаимодействие медиаторов с рецепторами пост-СМ, точнее говоря с их активными центрами, основано на структурной и стереоспецифичной комплементарности между ними. Все известные медиаторы обладают общим химическим свойством: наличием катионного азота на конце алифатической цепи, состоящей не менее чем из двух атомов углерода. Аминогруппы медиаторов (для ацетилхолина — триметиламмонийная группа) практически полностью ионизированы. Это обстоятельство указывает на электростатическое взаимодействие (притяжение, фиксация) медиаторов с анионным центром рецепторов. Таким образом, образование комплекса медиатор — рецептор происходит не за счет ковалентных связей, а путем межмолекулярных воздействий, в результате чего изменяется конформация рецептора и близлежащих участков мембраны. Изменение

конформации, по-видимому, является кооперативным процессом, не требующим большой затраты энергии. Взаимодействие медиаторов с рецепторами, состоящими, как правило, из субъединиц, может обратимо приводить к диссоциации олигомера на субъединицы и тем самым создавать ионофоры в пост-СМ. Важным доказательством конформационных переходов в рецепторных белках является феномен десенситизации, т. е. уменьшения чувствительности рецепторов при длительном воздействии медиатора. Этот феномен можно объяснить с позиции теории субстратного торможения ферментов. Мы уже упоминали, что реакция медиатора с рецептором во многом аналогична реакции субстратов с ферментами, но есть и два главных отличия: в ходе взаимодействия с рецептором медиатор не обменивается; взаимодействие индуцирует через триггерный механизм цепь дальнейших конформационных перестроек в эффекторной мембране.

При рассмотрении особенностей синаптической передачи поражает высокая надежность постсинаптических процессов (Л. Г. Магазаник, 1975). Запас надежности создается избыточным количеством секретируемого медиатора и значительной плотностью расположения рецепторов в пост-СМ. Дискретный характер работы рецепторов позволяет им включаться поочередно, при этом чем чаще происходят такие включения, тем большее число рецепторов будет вовлекаться в процесс из резерва. Квантовый механизм секреции медиаторов в сочетании с их обратным захватом в терминаль предотвращает возможность наступления аварийной ситуации — полного истощения резерва рецепторов.

Прежние представления о выделении передатчика терминалью как механизме передачи возбуждения дополнены данными о выделении спутников медиаторов. Известно также, что нервные окончания выделяют трофогены, которые образуются в перикарионе, поступают с аксотоком на периферию и утилизируются иннервируемой клеткой. Однако этим не исчерпывается круг процессов, «запускаемых» нервным окончанием. Можно полагать, что нервное окончание — это секреторный орган с многогранной функцией.

Еще менее изучена роль синапса в процессах обмена, осуществляющихся в направлении их иннервируемой структуры к иннервирующему нейрону. Такие антидромные процессы до недавнего времени вызывали лишь недоумение. Теперь становится все более очевидным, что эти процессы универсальны.

Существует еще одна область, которая требует специального внимания. Речь идет о принципе ауторегуляции уровня возбуждения в синапсе. В случаях, когда в каком-нибудь звене синаптической передачи происходит чрезмерная активация процесса, включаются механизмы ауторегуляции, нормализующие данный процесс.

Синапс только начинает открывать свои тайны. Нет сомнения, что уже в ближайшем будущем новые методы и новые идеи позволят получить сведения о сложной функции и разнообразии процессов, совершающихся в синапсах. Выяснение свойств синапсов и процессов, реализующих эти свойства, откроет пути целенаправленного вмешательства в деятельность нервной системы в условиях нормы и патологии. В достижении этих результатов важная роль будет принадлежать функциональной биохимии синапсов.

Открытие в 1973—1975 годах мозговых пептидов — модуляторов синаптической передачи открывает новые перспективы в исследовании функций ЦНС и их биохимической регуляции (И. П. Ашмарин, 1977). Здесь прежде всего следует указать на эндогенные морфиноподобные пептиды — анальгетики мозга человека и млекопитающих, которые взаимодействуют с опиатным рецептором эффекторных клеток, причем эта реакция блокируется N-аллилнороксиморфином (налоксон). Эти пептиды оказались производными гормона гипофиза  $\beta$ -липотропина, который содержит 91 аминокислоту. Вследствие расщепления  $\beta$ -липотропина специфическими протеиназами в разных нейронах и нервных окончаниях мозга появляются те или иные пептиды. Наиболее крупный пептид —  $\beta$ -эндорфин представляет собой C-концевой фрагмент  $\beta$ -липотропина с 61-го по 91-й остаток. Другие эндорфины ( $\gamma$ - и  $\alpha$ -) эквивалентны фрагментам гормона с 61-го по 77-й и с 61-го по 76-й остатки аминокислот соответственно.  $\beta$ -Эндорфин обладает длительным обезболивающим действием в дозах, в 20—200 раз меньших, чем у морфина. Кроме того, этот эндорфин играет важную роль в генезе шизофрении. Если  $\alpha$ -эндорфин проявляет свойства анальгетика и транквилизатора, то  $\gamma$ -эндорфин способен вызывать у животных агрессивное поведение. Низкомолекулярным пептидом является метэнкефалин (Н-тир-гли-гли-фал-мет-ОН), соответствующий фрагменту  $\beta$ -липотропина с 61-го по 65-й остаток. Кроме того, известен также лейэнкефалин, отличающийся от первого лишь 5-м остатком, т. е. лейцином. Энкефалины обладают кратковременным обезболивающим действием, особенно при внутримозговом введении. Все перечисленные пептиды локализованы преимущественно в лимбической части мозга, гипофизе и подбугорной области.

При взаимодействии пептидов — анальгетиков с рецепторами, как правило, снижается уровень цАМФ и увеличивается содержание цГМФ в соответствующих нейронах. Локализация пептидов в нервных окончаниях еще не установлена, хотя и можно предполагать их везикулярное происхождение. Эти пептиды способны также модулировать секрецию различных медиаторов.

Синаптическая функция данных пептидов мозга как медиаторов окончательно не установлена.

Оказалось, что в структуре  $\beta$ -липотропина позиции 41—58 соответствуют структуре  $\beta$ -меланоцитостимулирующего гормона, в которых в свою очередь заключен тетрапептид (Н-мет-глутамин-фал-ОН) — стимулятор запоминания. Этот тетрапептид можно получить также из АКТГ, а этот гормон, как и  $\beta$ -липотропин, входит в структуру протопептида-300. Необходимо отметить любопытный принцип экономии в природе: крупный полипептид может в критические ситуации подвергаться гидролизу пептидазами, образуя новые эндогенные физиологически активные пептиды.

Эти открытия создают фундамент принципиально новых подходов к изучению многих нервных и психических заболеваний, процессов памяти, в том числе и патологической.

## Литература

- Авакян О. М. Фармакологическая регуляция высвобождения и захвата норадреналина. Ереван, Изд-во АН Армянск. ССР, 1973.
- Авоян Р. Л. Холинорецепторы и физиологическая активность органических соединений. — «Успехи совр. биол.», 1975, т. 79, № 2, с. 252—270.
- Алексидзе Н. Г. Биохимическая характеристика нейроглии. — В кн.: Успехи нейрохимии. Л., 1974, с. 132—141.
- Альтшуллер Р. А., Граник В. Г. Фармакологическая регуляция функции норадренергических нейронов (физико-химический аспект). — «Ж. Всесоюзн. химического о-ва им. Менделеева», 1976, т. 21, с. 171—180.
- Аничков С. В. Избирательное действие медиаторных веществ. Л., «Медицина», 1974.
- Анохина И. П. Нейрохимические механизмы психических заболеваний. М., «Медицина», 1975.
- Ашмарин И. П. Загадки и откровения биохимии памяти. Л., Изд-во Ленинградск. ун-та, 1975.
- Бабминдра В. П. Структурная пластичность межнейронных синапсов. Л., Изд-во Ленинградск. ун-та, 1972.
- Бабминдра В. П., Брагина Т. А. О некоторых вопросах современной синаптологии. — В кн.: Нервная система. Л., 1975, с. 3—17.
- Боголепов Н. Н. Ультраструктура синапсов в норме и патологии. М., «Медицина», 1975.
- Болдырев А. А. Биохимические аспекты электромеханического сопряжения. М., Изд-во Московск. ун-та, 1977.
- Бродский В. Я. Трофика клетки. М., «Наука», 1966.
- Буданцев А. Ю. Моноаминергические системы мозга. М., «Наука», 1976.
- Бузников Г. А. Низкомолекулярные регуляторы эмбрионального развития. М., «Наука», 1967.
- Бунятян Г. Х. Новейшие достижения в области биохимии и биохимической фармакологии ГАМЖ. — «Ж. Всесоюзн. химического о-ва им. Менделеева», 1976, т. 21, с. 130—136.
- Вайсфельд И. Л. Значение гистамина для деятельности нервной системы. — «Успехи физиол. наук», 1970, т. 1, № 3, с. 51—69.
- Гейнисман Ю. Я. Структурные и метаболические проявления функции нейрона. М., «Наука», 1974.
- Гинецинский А. Г. Об эволюции функций и функциональной эволюции. Л.—М., Изд-во АН СССР, 1961.
- Глебов Р. Н. Локальный и зависимый от аксонального тока синтез белка и РНК в нервных окончаниях. — В кн.: Успехи нейрохимии. Л., 1974, с. 39—49.
- Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Синаптические АТФ-азы и секреция медиаторов. — «Успехи физиол. наук», 1975, т. 6, № 4, с. 3—33.
- Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Аксональный ток веществ при различных физиологических и патологических состояниях нервной системы. — «Успехи совр. биол.», 1976, т. 82, № 3(6), с. 417—436.
- Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Молекулярные механизмы секреции медиаторов. — В кн.: Вопросы биохимии мозга. Ереван, 1976, с. 171—196.
- Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Специфические белки синаптических структур. — «Укр. біохім. Ж.», 1977, № 2, с. 122—133.
- Голиков С. Н., Розенгардт В. И. Холинэстеразы и антихолинэстеразные вещества. Л., «Медицина», 1964.

- Горкин В. З. Современные достижения в области биохимии катехоламинов. — «Вопр. мед. химии», 1974, т. 20, № 3, с. 227—238.
- Горкин В. З. Новые данные о природе и свойствах моноаминоксидаз и ингибиторах этих ферментов. — «Ж. Всесоюзн. химического о-ва им. Менделеева», 1976, т. 21, с. 181—185.
- Грачева Н. Д. Авторадиография синтеза нуклеиновых кислот и белков в нервной системе. Л., «Наука», 1968.
- Громова Е. А. Серотонин и его роль в деятельности центральной нервной системы. — «Успехи физиол. наук», 1970, т. 1, № 3, с. 25—50.
- Демин Н. Н. Некоторые пути влияния ацетилхолина на метаболизм нервной ткани. — В кн.: Проблемы нейрохимии. М.—Л., 1966, с. 197—208.
- Закусов В. В. Фармакология центральных синапсов. М., «Медицина», 1973.
- Изменение активности ацетилхолинэстеразы и Na, K-АТФ-азы при электростимуляции изолированных нервных окончаний головного мозга крыс. — «Докл. АН СССР», 1974, т. 215, № 5, с. 1247—1249. — Авт.: Р. Н. Глебов, Н. М. Дмитриева, В. К. Луценко и др.
- Кабачник М. И. Влияние фосфорноорганических веществ на передачу нервного возбуждения. — «Вестн. АН СССР», 1968, № 5, с. 86—94.
- Каменская М. А. Современные представления о механизме квантового освобождения медиатора из моторных нервных окончаний скелетной мышцы. — «Успехи физиол. наук», 1972, т. 3, № 3, с. 22—65.
- Коган А. Б. Тормозная перестройка структурно-метаболической организации нервной клетки. — «Ж. эволюц. биохим.», 1969, т. 5, № 1, с. 3—9.
- Кометиани З. П. Ферментативный механизм транспорта ионов. — «Укр. биохим. ж.», 1971, № 1, с. 53—59.
- Кометиани З. П., Джариашвили Т. Я., Цакадзе Л. Г. Действие ацетилхолина на Na, K-АТФ-азу синапсом. — «Биохимия», 1975, т. 40, с. 1039—1046.
- Кометиани П. А. О механизмах действия циклической аденозинмонофосфорной кислоты. Тбилиси, «Мецниереба», 1974.
- Комиссаров И. В. Элементы теории рецепторов в молекулярной фармакологии. М., «Наука», 1969.
- Конев С. В., Вологовский И. Д., Финин В. С. Структурные перестройки биологических мембран, индуцируемые циклическим АМФ. — «Докл. АН СССР», 1975, т. 223, № 6, с. 1473—1476.
- Копаладзе Р. А., Семиохина А. Ф., Кольс О. Р. Физико-химические аспекты возбуждения и торможения в коре больших полушарий головного мозга крыс. — «Научн. докл. высшей школы (Биол. науки)», 1976, № 9, с. 32—35.
- Костюк П. Г. Электрические явления на поверхностной мембране при активном транспорте ионов. — В кн.: Структура и функция биологических мембран. М., 1975, с. 183—196.
- Краткий курс молекулярной фармакологии. Под ред. П. В. Сергеева. М., «Медицина», 1975.
- Крепс Е. М. Фосфолипиды клеточных мембран нервной системы в развитии животного мира. — Л., «Наука», 1967.
- Крыжановский Г. Н., Поздняков О. М., Полгар А. А. Патология синаптического аппарата мышцы. М., «Медицина», 1974.
- Кузнецов В. И. Глутамат и цинк в передаче нервных импульсов в гигантских синапсах мышечных волокон гиппокамповой формации. — В кн.: Нейрохимия и физиология синаптических процессов. Пущино-на-Оке, 1976, с. 26—47.
- Курский М. Д., Бакшеев Н. С. Биохимические основы механизма действия серотонина. Киев, «Наукова думка», 1974.
- Ленков Д. Н. Везикулярная гипотеза синаптической передачи. — В кн.: Физиология человека и животных. Т. 10. Физиология нейрона. М., 1972, с. 40—123.
- Магазаник Л. Г. Функциональная организация холинорецептивных постсинаптических мембран. — В кн.: Структура и функция биологических мембран. М., 1975, с. 240—265.
- Манухин Б. Н. Физиология адренорецепторов. М., «Наука», 1968.



- Макогоненко Е. М., Кудинов С. О., Алексеенко Н. Р. Солюбилизация Mg-зависимой, Са-активируемой АТФ-азы фракции синаптических мембран синапсом. — «Укр. біохім. ж.», 1975, № 1, с. 55—60.
- Матлина Э. Ш. Регуляция биосинтеза катехоламинов при физиологических и патологических состояниях, связанных с нарушением функции нервной системы. — «Ж. Всесоюзн. химического о-ва им. Менделеева», 1976, т. 21, с. 157—164.
- Матюшкин Д. П. О функциональных обратных связях в синапсе (факты и гипотезы). Л., Изд-во Ленинградск. ун-та, 1975.
- Михельсон М. Я., Зеймаль Э. В., Ацетилхолин. Л., «Наука», 1970.
- Палладин А. В., Белик Я. В., Полякова Н. М. Белки головного мозга и их обмен. Киев, «Наукова думка», 1972.
- Певзнер Л. З. Функциональная биохимия нейроглии. Л., «Наука», 1972.
- Ройтбак А. И. Гипотеза о механизме образования временных связей. — «Докл. АН СССР», 1969, т. 187, № 5, с. 1205—1208.
- Сахаров Д. А. Генеалогия нейронов. М., «Наука», 1974.
- Северин С. Е. Участие природных имидазолсодержащих дипептидов в биосинтезе и рецепции ацетилхолина. — «Успехи совр. биол.», 1967, т. 64, № 5, с. 181—196.
- Структурно-функциональные изменения в синаптических мембранах коры головного мозга крыс при электростимуляции in vitro. — «Биохимия», 1976, т. 41, с. 975—981. — Авт.: Р. Н. Глебов, Г. Н. Крыжановский, Л. А. Маликова и др.
- Сытинский И. А. Гамма-аминомасляная кислота в деятельности нервной системы. Л., «Наука», 1972.
- Суворов Н. Н. Производные индола в нейрофизиологии и психофармакологии. — «Ж. Всесоюзн. химического о-ва им. Менделеева», 1976, т. 21, с. 144—151.
- Ташмухамедов Б. А., Гагельганс А. И. Активный транспорт ионов через биологические мембраны. Ташкент, «Фан», 1973.
- Тихонов В. Х., Валеева Р. М., Мезенцев А. Н. Действие ацетилхолина, суабанина и серотонина на включение аминокислот в белки срезов мозга крыс при различной концентрации КС1 в среде. — «Укр. біохім. ж.», 1973, № 3, с. 271—274.
- Туманова С. Ю. Участие ганглиозидов в деятельности нервной системы. — В кн.: Нервная система. Л., 1973, вып. 13, с. 41—62.
- Турпаев Т. М. Медиаторная функция ацетилхолина и природа холинорецептора. М., Изд-во АН СССР, 1962.
- Турпаев Т. М. Регуляция медиаторного процесса биохимическим механизмом обратной связи. — В кн.: Биохимия и функция нервной системы. Л., 1967, с. 234—243.
- Турпаев Т. М., Сахаров Д. А. Эволюция холинергического медиаторного процесса. — «Ж. эволюц. биохим.», 1967, т. 3, № 5, с. 482—488.
- Утевский А. М., Расин М. С. Катехоламины и кортикостероиды (молекулярные аспекты взаимоотношений двух основных адаптационных систем). — «Успехи совр. биол.», 1972, т. 73, № 3, с. 323—341.
- Физиология и фармакология синаптической передачи. Под ред. П. Г. Костюка, Л., «Наука», 1973.
- Харченко Н. К., Кудинов С. А., Полякова Н. М. Влияние катионов на АТФ-азную активность синаптических пузырьков. — «Укр. біохім. ж.», 1973, № 3, с. 318—322.
- Ходоров Б. И. Физиология возбудимых мембран. М., «Наука», 1974.
- Чернух А. М., Александров П. Н., Алексеев О. В. Микроциркуляция. М., «Медицина», 1975.
- Шамарина Н. М. Синаптическая передача в тонических и нетонических мышцах. М., «Наука», 1971.
- Шаповалов А. И. Клеточные механизмы синаптической передачи (в физиологическом и фармакологическом освещении). М., «Медицина», 1966.

- Штарк М. Б., Колпаков В. Г., Фукс Б. Б. Циклический аденозин-3', 5'-монофосфат и функции нейрона. — «Успехи совр. биол.», 1974, т. 78, № 1(4), с. 76—91.
- Щипакина Т. Г. Регуляция обмена ГАМК в структурах лимбической системы мозга. — В кн.: Нейрохимия и физиология синаптических процессов. Пушчино-на-Оке, 1976, с. 6—25.
- Abood L. G., Hoss W. Kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  adsorption and cationic selectivity with a synaptic membrane protein. — «Biochim. biophys. Acta», 1974, v. 332, p. 85—96.
- Akeri K. Dynamic aspects of synaptic ultrastructure. — «Brain Res.», 1973, v. 49, p. 511—518.
- Albers R. W. Biochemical aspects of active transport. — «Ann. Rev. Biochem.», 1967, v. 36, p. 727—756.
- Axelrod J. The fate of noradrenaline in the sympathetic neurone. — «Harvey Lectures», 1973, Ser. 67, p. 175—197.
- Barberis C., McIlwain H. 5'-adenine mononucleotides in synaptosomal preparations from guinea pig neocortex: their change on incubation, superfusion and stimulation. — «J. Neurochem.», 1976, v. 26, p. 1015—1022.
- Benjamin A. M., Quastel J. H. Metabolism of amino acids and ammonia in rat brain cortex slices in vitro: a possible role of ammonia in brain function. — «J. Neurochem.», 1975, v. 25, p. 197—206.
- Berl S., Puszkin S., Nicklas W. J. Actomyosin-like protein in brain. — «Science», 1973, v. 179, p. 441—446.
- Birks R. J., Cohen M. W. The action of Na-pump inhibitors on neuromuscular transmission. — «Proc. roy. Soc. Biol. (N. Y.)», 1968, v. 170, p. 381—399.
- Birdsall N. J., Hulme E. C. Biochemical studie on muscarine acethylcholine receptors. — «J. Neurochem.», 1976, v. 27, p. 7—16.
- Bitensky M. W., Gorman R. E. Cellular responses to cyclic AMP. — «Progr. biophys. molec. Biol.», 1973, v. 26, p. 409—461.
- Blaustein M. P., Ector A. C. Carried-mediated Na-dependent and Ca-dependent Ca-efflux from synaptosomes in vitro. — «Biochim. biophys. Acta», 1976, v. 419, p. 295—308.
- Blaustein M. P., Goldring J. M. Membrane potentials in pinchedoff presynaptic nerve terminals monitored with a fluorescent probe: evidence that synaptosomes have K diffusion potentials. — «J. Physiol. (Lond.)», 1975, v. 247, p. 589—615.
- Blitz A. L., Fine R. E. Muscle-like contractile proteins and tubulin in synaptosomes. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1974, v. 71, p. 4472—4476.
- Bogdansky D. F., Tissari A. H., Brodie B. Mechanism of transport and storage of biogenic amine. — «Biochim. biophys. Acta», 1970, v. 219, p. 189—198.
- Bradford H. F. Metabolic response of synaptosomes to electrical stimulation: release of amino acids. — «Brain Res.», 1970, v. 19, p. 239—247.
- Brody M. J., Kadowitz P. J. Prostaglandins as modulators of the autonomic nervous system. — «Fed. Proc.», 1974, v. 33, p. 48—60.
- Bryan J. Biochemical properties of microtubules. — «Fed. Proc.», 1974, v. 33, p. 152—157.
- Burnstock G. Purinergic nerves. — «Pharmacol. Rev.», 1972, v. 24, p. 509—581.
- Chao L.-P. Subunits of choline acetyltransferase. — «J. Neurochem.», 1975, v. 25, p. 261—266.
- Chappuis A., Ens A., Iwangoff P. The influence of adrenergic effectors on the cationic pump of brain cell membrane. — «Triangle», 1975, v. 14, p. 93—98.
- Cools A. R., Van Rossum J. M. Excitation-mediating and inhibition-mediating gopamine-receptors: a new concept towards a better understanding of electrophysiological, biochemical, pharmacological, functional and clinical data. — «Psychopharmacologica (Berl.)», 1976, v. 45, p. 243—254.

- Cotman C. W., Haycock J. W., White W. F.* Stimulus-secretion coupling processes in brain: analysis of NA and GABA release. — «*J. Physiol. (Lond.)*», 1976, v. 254, p. 475—505.
- Csillik B.* Synaptochemistry. Outlines and scope of a discipline. — «*J. Neural Transm.*», 1974, v. 35, Suppl. 11, p. 13—42.
- Cupello A., Hyden H.* Fractionation of RNA from brain synaptosomes and cytoplasmic subcellular fractions. — «*J. Neurochem.*», 1975, v. 25, p. 399—406.
- Curtis D. R., Johnston G. A.* Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. — «*Rev. Physiol.*», 1974, v. 69, p. 97—188.
- De Belleruche J. S., Bradford H. F., Jones D. G.* A study of the metabolism and release of dopamine and amino acids from nerve endings isolated from sheep corpus striatum. — «*J. Neurochem.*», 1976, v. 26, p. 561—571.
- De Robertis E.* Ultrastructure and cytochemistry of the synaptic region. — «*Science*», 1967, v. 156, p. 907—914.
- De Robertis E.* Synaptic receptor proteins. Isolation and reconstitution in artificial membranes. — In: *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Berlin, 1975, p. 9—38.
- De Robertis E., Fiszer de Plazas S.* Isolation of hydrophobic proteins binding amino acids. Stereoselectivity of the binding of l-[<sup>14</sup>C]-glutamic acid in cerebral cortex. — «*J. Neurochem.*», 1976, v. 26, p. 1237—1244.
- Droz B.* Renewal of synaptic proteins. — «*Brain. Res.*», 1973, v. 62, p. 383—394.
- Dudai Y., Herzberg M., Silman I.* Molecular structures of acetylcholinesterase from electric organ tissue of the electric eel. — «*Proc. nat. Acad. Sci. USA*», 1973, v. 70, p. 2473—2476.
- Duncan C. J.* Properties of the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of mammalian synaptic membrane preparation. — «*J. Neurochem.*», 1976, v. 27, p. 1277—1279.
- Dunn A. J., Bondy S. C.* Functional chemistry of the brain. New York, 1974.
- (*Eccles J.*) Экклс Д. Тормозные пути центральной нервной системы. Пер. с англ. М., «Мир», 1971.
- Escueta A. V., Appel S. H.* Biochemical studies of synapses in vitro. II. Potassium transport. — «*Biochemistry (Wash.)*», 1969, v. 8, p. 725—733.
- Ferrendelli J. A., Chang M. M., Kinscheff D. A.* Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. — «*J. Neurochem.*», 1974, v. 22, p. 535—540.
- Fonnum F.* Choline acetyltransferase binding to and release from membrane. — «*Biochem. J.*», 1968, v. 109, p. 389—398.
- Gage P. W.* Generation of end-plate potentials. — «*Physiol. Rev.*», 1976, v. 56, p. 177—247.
- Geffen L. B., Livett B. G.* Synaptic vesicles in sympathetic neurons. — «*Physiol. Rev.*», 1971, v. 51, p. 98—157.
- Germain M., Proulx P.* ATPase activity in synaptic vesicles of rat brain. — «*Biochem. Pharmacol.*», 1965, v. 14, p. 1815—1819.
- Gerschenfeld H. M.* Chemical transmission in invertebrate central nervous systems and neuromuscular junctions. — «*Physiol. Rev.*», 1973, v. 53, p. 2—119.
- Ginsborg B. L.* Ion movements junctional transmission. — «*Pharmacol. Rev.*», 1967, v. 19, p. 289—316.
- Gisiger V.* Triggering of RNA synthesis by acetylcholine stimulation of the postsynaptic membrane in a mammalian sympathetic ganglion. — «*Brain. Res.*», 1971, v. 33, p. 139—146.
- Goddard G. A., Robinson J. D.* Uptake and release of Ca<sup>2+</sup> by rat brain synaptosomes. — «*Brain Res.*», 1976, v. 110, p. 331—350.
- Goldstein M., Fuxe K., Hökfelt T.* Characterization and tissue localization of catecholamine synthesizing enzymes. — «*Pharmacol. Rev.*», 1972, v. 24, p. 293—310.

- Greengard P., Kebabian J. W.* Role of cyclic AMP in synaptic transmission in the mammalian peripheral nervous system. — «Fed. Proc.», 1974, v. 33, p. 1059—1067.
- Gulaberg H. C., Marsden C. A.* Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role. — «Pharmacol. Rev.», 1975, v. 27, p. 135—206.
- Gullis R. J., Rowe C. E.* The stimulation by synaptic transmitters of the incorporation of oleate into the phospholipid of synaptic membranes. — «Biochem. J.», 1975, v. 148, p. 557—565.
- Guth L.* Trophic effects on vertebrate neurons. — «Neurosci. Res. Prog. Bull.», 1969, v. 7, p. 1—70.
- Haga T.* Synthesis and release of <sup>14</sup>C-ACh in synaptosomes. — «J. Neurochem.», 1971, v. 18, p. 781—790.
- Haggendal J.* Some further aspects on the release of the adrenergic transmitter. — In: New aspects of release mechanisms of catecholamines. New York, 1970, p. 100—109.
- Hajos F.* An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity. — «Brain Res.», 1975, v. 93, p. 485—489.
- Hamon M., Glowinski J.* Regulation of serotonin synthesis. — «Life Sci.», 1974, v. 15, p. 1533—1548.
- Heuser J. E., Reese T. S.* Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. — «J. Cell. Biol.», 1973, v. 57, p. 315—344.
- Hubbard J. I.* Microphysiology of vertebrate neuromuscular transmission. — «Physiol. Rev.», 1973, v. 53, p. 674—723.
- Huttunen M. O.* General model for the molecular events in synapses during learning. — «Perspect. Biol. Med.», 1973, v. 17, p. 103—108.
- Isolation and characterization of soluble acidic lipoproteins from rat brain synaptic vesicles.* — «J. Neurochem.», 1973, v. 21, p. 557—572. — Aut.: M. Soller, H. Koenig, R. Mylroie et al.
- Iversen L. L.* Uptake mechanisms for neurotransmitter amines. — «Biochem. Pharmacol.», 1974, v. 23, p. 1927—1935.
- Iversen L. L.* Dopamine receptors in the brain. — «Science», 1975, v. 188, p. 1084—1089.
- Jacobs M.* Tubulin nucleotide reactions and their role in microtubule assembly and dissociation. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1975, v. 253, p. 562—572.
- Jarborough J. J.* Urabain antagonism of noradrenaline inhibitions of cerebellar Purkinje cells and dopamine inhibitions of candate neurons. — «Neuropharmacol.», 1976, v. 15, p. 335—338.
- Jeffrey P. L., Austin L.* Axoplasmic transport. — «Progr. Neurobiol.», 1973, v. 2, p. 205—255.
- John R.* Mechanism of memory. New York, 1967.
- Jorgensen O. S.* Localization of the antigens D1, D2 and D3, in the rat brain synaptic membrane. — «J. Neurochem.», 1976, v. 27, p. 1223—1227.
- Kadota K., Kanaseki T.* Isolation of a synaptic vesicle fraction from guinea-pig brain with the use of DEAE sephadex column chromatography and some of its properties. — «J. Biochem.», 1969, v. 65, p. 839—842.
- Karlin A.* Molecular interactions of the acetylcholine receptor. — «Fed. Proc.», 1973, v. 32, p. 1847—1853.
- (Katz B.) Катц Б. Нерв, мышца и синапс. Пер. с англ. М., «Мир», 1968.
- Katz B.* The release of neurotransmitter substances. Springfield, 1969.
- Katz N. L.* The effects of frog neuromuscular transmission of agents which act upon microtubules and microfilaments. — «Europ. J. Pharmacol.», 1972, v. 19, p. 88—93.
- Keen P., White T. D.* A light-scattering technique for the study of the permeability of rat brain synaptosomes in vitro. — «J. Neurochem.», 1970, v. 17, p. 565—572.
- Krnjević K.* Chemical nature of synaptic transmission in vertebrates. — «Physiol. Rev.», 1974, v. 54, p. 418—540.

- Kurijama K., Weinstein H., Roberts E.* Uptake of  $\gamma$ -aminobutyric acid by mitochondrial and synaptosomal fractions from mouse brain. — «Brain Res.», 1969, v. 16, p. 479—492.
- Kuroda Y., McIlwain H.* Uptake and release of [ $^{14}$ C]-adenine derivatives at beds of mammalian cortical synaptosomes in a superfusion system. — «J. Neurochem.», 1974, v. 22, p. 691—700.
- Lagercrantz H.* On the composition and function of large dense cored vesicles in sympathetic nerves. — «Neuroscience», 1976, v. 1, p. 81—92.
- Lähdesmäki P., Pasula M., Oja S. S.* Effect of electrical stimulation and chlorpromazine on the uptake and release of taurine,  $\gamma$ -aminobutyric acid and glutamic acid in mouse brain synaptosomes. — «J. Neurochem.», 1975, v. 25, p. 675—680.
- Lee K. S., Klaus W.* The subcellular basis for the mechanism of inotropic action of cardiac glycosides. — «Pharmacol. Rev.», 1971, v. 23, p. 193—261.
- Madeira V. M., Antunes-Madeira M. C.* Interaction of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  with synaptic plasma membranes. — «Biochim. biophys. Acta», 1973, v. 323, p. 396—407.
- Mahler H. R., Wang Y.-J., Crawford G.* Disposition and function of polypeptides in synaptic plasma membranes. — «J. Cell Biol.», 1975, v. 67, p. 255—265.
- Marchbanks R. M., Campbell C. W.* Sodium and chloride fluxes in synaptosomes in vitro. — «J. Neurochem.», 1976, v. 26, p. 973—981.
- Marchbanks R. M., Israel M.* The heterogeneity of bound acetylcholine and synaptic vesicles. — «Biochem. J.», 1972, v. 129, p. 1049—1061.
- Martin D. L.* Kinetics of the Na-dependent transport of GABA by synaptosomes. — «J. Neurochem.», 1973, v. 21, p. 345—356.
- McIlwain H.* Ion movement in isolated preparation from the mammalian brain. — «Prog. Brain Res.», 1968, v. 29, p. 273—280.
- Michell R. H.* Inositol phospholipids and cell surface receptor function. — «Biochim. biophys. Acta», 1975, v. 415, p. 81—147.
- Miledi R.* Transmitter release induced by injection of calcium ions into nerve terminals. — «Proc. roy Soc. B.», 1973, v. 183, p. 421—425.
- Molenaar P. C., Polak R. L., Nickolson V. J.* Subcellular localization of newly formed [ $^3$ H]-acetylcholine in rat cerebral cortex in vitro. — «J. Neurochem.», 1973, v. 21, p. 667—678.
- Morgan I. G., Vincendon G., Gombos G.* Adult rat brain synaptic vesicles. I. Isolation and characterization. — «Biochim. biophys. Acta», 1973, v. 320, p. 671—680.
- Ochs S.* Fast axoplasmic transport of materials in mammalian nerve and its integrative role. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1972, v. 193, p. 43—58.
- Paton W. D., Vizi E. S., Aboo Z. M.* The mechanism of acetylcholine release from parasympathetic nerves. — «J. Physiol. (Lond.)», 1971, v. 215, p. 819—831.
- Pfenninger K. H., Rovainen C. M.* Stimulation and Ca-dependence of vesicle attachment sites in the presynaptic membrane: a freeze-cleave study on the lamprey spinal cord. — «Brain Res.», 1974, v. 72, p. 1—23.
- Philippu A., Becke H., Burger A.* Effect of drug on the uptake of noradrenaline by isolated hypothalamic vesicles. — «Europ. J. Pharmacol.», 1969, v. 6, p. 96—101.
- Poisner A. M.* Release of transmitters from storage: a contractile model. — In: Biochemistry of simple neuronal model. New York, 1970, p. 95—108.
- Potter L. T.* Properties of nicotinic acetylcholine receptors. — In: Neurochemistry cholinergic receptors. New York, 1974, p. 31—35.
- Prives C., Quastel J. H.* Effect of cerebral stimulation of biosynthesis of nucleotides and RNA in brain slices in vitro. — «Biochim. biophys. Acta», 1969, v. 182, p. 285—294.
- Puszkín S., Kochwa S.* Regulation of neurotransmitter release by a complex of actin with relaxing protein isolated from rat brain synaptosomes. — «J. Biol. Chem.», 1974, v. 249, p. 7711—7714.

- Puszkin S., Nicklas W. J., Berl S.* Actomyosin-like protein in brain: subcellular distribution. — «J. Neurochem.», 1972, v. 19, p. 1319—1333.
- Rang H. P.* Acetylcholine receptors. — «Quart. Rev. Biophys.», 1974, v. 7, p. 283—399.
- Rasmussen H.* Cell communication,  $Ca^{2+}$  ion and cyclic ANP. — «Science», 1970, v. 170, p. 404—412.
- Redburn D. A., Poisner A. M., Samson F. E.* Comparison of microtubule protein (tubulin) from adrenal medulla and brain. — «Brain Res.», 1972, v. 44, p. 615—624.
- Reddington M., Tan L. P., Lagnado J. R.* The phosphorylation of brain microtubular protein in situ and in vitro. — «J. Neurochem.», 1976, v. 27, p. 1229—1236.
- Robinson J. D.* Proposed reaction mechanism for the Na, K-dependent ATPase. — «Nature», 1971, v. 233, p. 419—421.
- Robison G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W.* Cyclo AMP. New York, 1971.
- Rubin R. P.* The role of calcium in the release of neurotransmitters substances and hormones. — «Pharmacol. Rev.», 1970, v. 22, p. 389—428.
- Schmitt F. O.* Fibrous proteins neuronal organelles. — «Proc. nat. Acad. Sci. USA», 1968, v. 60, p. 1092—1101.
- Schwartz A., Lindenmayer G. E., Allen I. C.* The Na, K-ATPase: pharmacological physiological and biochemical aspects. — «Pharmacol. Rev.», 1975, v. 27, p. 3—134.
- Simon J. R., Kuhar M. J.* High affinity choline uptake: ionic and energy requirements. — «J. Neurochem.», 1976, v. 27, p. 93—99.
- Shepherd G. M.* The synaptic organization of the brain. An introduction. New York, 1974.
- Skou J. C.* The  $Na^+$ ,  $K^+$ -activated enzyme system. — In: Perspectives in membrane of biology. New York, 1974, p. 263—278.
- Smith A. D.* Summing up: some implications of the neuron as a secreting cell. — «Phil. Trans. Roy Soc. (London) Ser. B», 1971, v. 261, p. 423—437.
- Smythies J. R.* The chemical anatomy of recept mechanism. Receptors. — «Int. Rev. Neurobiol.», 1971, v. 14, p. 233—261.
- Stahl W. J., Swanson P. D.* Movements of Ca and other cations in isolated cerebral tissues. — «J. Neurochem.», 1971, v. 18, p. 415—422.
- Stjarne L.* Quantal or graded secretion of adrenal medullary hormone and sympathetic neurotransmitter. — In: New aspects of storage and release mechanisms of catecholamines. H. J. Schumann, G. Kroneberg (Eds.). New York, 1970, p. 112—130.
- Structure and biological activity of a series of conformationally restricted analogues of GABA.* — «J. Neurochem.», 1975, v. 25, p. 803—810. — Aut.: P. Krosggaard-Larsen, G. A. R. Johnston, D. R. Curits et al.
- Synaptic biochemistry of amino acids.* — «Fed. Proc.», 1973, v. 32, p. 2039—2047. — Aut.: S. H. Snyder, A. B. Young, J. P. Bennett et al.
- Tamir H., Klein A., Rapport M. M.* Serotonin binding protein: enhancement of binding by  $Fe^{2+}$  and inhibition of binding by drugs. — «J. Neurochem.», 1976, v. 26, p. 871—878.
- Tan A. T.* Mobilization of synaptic membrane-bound  $Ca^{2+}$  by acidic amino acids. — «J. Neurochem.», 1975, v. 24, p. 127—134.
- Taugner G.* The membrane of catecholamine storage vesicles of adrenal medulla. Uptake and release of noradrenaline in relation to the pH and the concentration and steric configuration of the amine present in the medium. — «Naun-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.», 1972, v. 274, p. 299—314.
- The proteins of nerve-ending membrane.* — In: Protein nervous system. New York, 1973, p. 171—192. — Aut.: I. G. Morgan, W. C. Breckenridge, G. Vincendon et al.
- Therien H. M., Mushynski W. E.* Isolation of synaptic junctional complexes of high structural integrity from rat brain. — «J. Cell Biol.», 1976, v. 71, p. 807—822.

- Thoenen H.* Trans-synaptic enzyme induction. — «Life Sci.», 1974, v. 14, p. 223—235.
- Triggle D. J.* Chemical aspects of the autonomic nervous system. London, 1965.
- Ueda T., Maeno H., Greengard P.* Regulation of endogenous phosphorylation of specific proteins in synaptic membrane fractions from rat brain by cAMP. — «J. Biol. Chem.», 1973, v. 248, p. 8295—8305.
- Valdés F., Orrego F.* Interaction of glycine with brain-cortex membrane fragments: kinetics, ionic requirements and amino-acid specificity. — «Brain Res.», 1975, v. 97, p. 277—290.
- Verity M. A.* Cation modulation of synaptosomal respiration. — «J. Neurochem.», 1972, v. 19, p. 1305—1317.
- Vizi E. S.* Stimulation by inhibition of Na, K, Mg-activated ATPase of acetylcholine release in cortical slices from rat brain. — «J. Physiol. (Lond.)», 1972, v. 216, p. 95—117.
- Von Euler U. S.* Synthesis, uptake and storage of catecholamines in adrenergic nerves. The effect of drugs. — In: Handbook of experimental pharmacology. Berlin, 1972, p. 180—230.
- Von Hanh H. P., Honegger C. G.* Animal neurotoxins in neurobiological research. — «Experientia», 1974, v. 30, p. 2—7.
- Weiner N.* Regulation of norepinephrine synthesis. — «Ann. Rev. Pharmacol.», 1970, v. 10, p. 273—290.
- White T. D., Keen P.* Effects of inhibitors of Na, K-ATPase on the uptake of norepinephrine by synaptosomes. — «Molec. Pharmacol.», 1971, v. 7, p. 40—45.
- Whittaker V. P.* The application of subcellular fractionation techniques to the study of brain function. — «Progr. biophys. molec. Biol.», 1965, v. 15, p. 39—96.
- Whittaker V. P.* The biochemistry of synaptic transmission. — «Naturwissenschaften», 1973, Bd 60, S. 281—289.
- Whittam R., Chipperfield A. R.* The reaction mechanism of the Na-pump. — «Biochim. biophys. Acta», 1975, v. 415, p. 149—171.
- Winkler H.* The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. — «Neurosci.», 1976, v. 1, p. 65—80.
- Wooten G. F., Kopin I. J., Axelrod J.* Effects of colchicine and Vinblastine on axonal transport and transmitter release in sympathetic nerves. — «Ann. N. Y. Acad. Sci.», 1975, v. 253, p. 528—534.
- Youdim M. B., Hamon M., Bourgoin S.* Properties of partially purified pig brain stem tryptophan hydroxylase. — «J. Neurochem.», 1975, v. 25, p. 407—414.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение . . . . .	3
<b>Часть I. Основные процессы обмена в синапсах . . . . .</b>	<b>6</b>
Глава 1. Структура и функции химических синапсов . . . . .	6
Глава 2. Взаимосвязь аксонального тока макромолекул и органелл с функцией синапсов . . . . .	29
Глава 3. Биоэнергетические процессы в синаптических структурах	47
Глава 4. Обмен белков в синаптических структурах . . . . .	57
Глава 5. Обмен липидов в синаптических структурах . . . . .	75
Глава 6. Пассивный и активный транспорт ионов . . . . .	97
<b>Часть II. Специфические механизмы синаптической передачи . . . . .</b>	<b>124</b>
Глава 7. Квантово-везикулярная теория секреции медиаторов . . . . .	124
Глава 8. Сократительная природа секреции медиаторов . . . . .	155
Глава 9. Прямые и обратные транссинаптические связи . . . . .	168
<b>Часть III. Биохимия медиаторных систем . . . . .</b>	<b>196</b>
Глава 10. Биохимия холинэргических синапсов . . . . .	196
Глава 11. Биохимия адренэргических синапсов . . . . .	220
Глава 12. Биохимия серотонинэргических синапсов . . . . .	261
Глава 13. Медиаторные аминокислоты . . . . .	278
Глава 14. Биохимия пептид-, пурин- и гистаминэргических нейронов	303
Заключение . . . . .	311
Литература . . . . .	317



ИБ № 1065

**Рудольф Николаевич Глебов,  
Георгий Николаевич Крыжановский**  
**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ БИОХИМИЯ СИНАПСОВ**

Редактор *Е. М. Кедрова*  
Художественный редактор *Т. М. Смага*  
Техн. редактор *Н. И. Людковская*  
Корректор *Т. А. Кузьмина*  
Переплет художника *В. М. Полисского*

Сдано в набор 24.05.78. Подписано к печати 20.07.78.  
Т-14803. Формат бумаги 60×90<sup>1/16</sup>. Бум. тип. № 1.  
Лит. гарн. Печать высокая. Усл. печ. л. 20,5. Уч.-изд.  
л. 21,26. Тираж 5 000 экз. Заказ № 623. Цена 2 р. 60 к.

Издательство «Медицина», Москва, 101838.  
Петроверигский пер. 6/8

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома  
при Государственном комитете Совета Министров  
СССР по делам издательств, полиграфии и книжной  
торговли. Москва, 113105, Нагатинская ул., д. 1

### *К сведению читателей!*

В 1979 г. в издательстве «Медицина» выйдет книга Е. Л. РОЗЕНФЕЛЬД и И. А. ПОПОВОЙ «Гликогеновая болезнь».

В этой книге будут освещены современные данные о структуре и обмене гликогена в норме и при врожденных наследственных заболеваниях — гликогенозах; описаны различные формы и типы этих заболеваний, современные принципы их классификации, особенности нарушений гликогенового обмена при различных типах гликогенозов.

Особое внимание будет уделено вопросу о биохимической диагностике различных типов гликогеновой болезни, будут рассмотрены современные данные о различных способах лечения гликогенозов — хирургических и терапевтических: заместительной энзимотерапии, гормоно-, химио- и диетотерапии.

Книга представит интерес для биохимиков, генетиков, а также педиатров и терапевтов.

Книги издательства «Медицина» поступают для продажи в специализированные книжные магазины и магазины, имеющие отделы медицинской литературы.



**МЕДИЦИНА — 1978**