

Архив журнала

## Вопросы медицинской химии

ISSN 0042-8809

1990

Том 36 выпуск 2

**Внимание!** Распознавание текста проведено в автоматическом режиме для облегчения работы поисковых систем. Будьте внимательны при копировании, возможны ошибки и неточности. Используйте сканированный графический вариант.

Archive of journal

## Voprosy meditsinskoi khimii

ISSN 0042-8809

1990

Volume 36 issue 2

**Attention!** OCR has been performed automatically for search engines only. Be careful when copying, errors are possible. Use scanned picture as standard.

<http://pbmc.ibmc.msk.ru>

14. Скинпетров В. П. Тканевая система свертывания крови и тромбгеморрагический синдром в хирургии.— Саранск, 1978.
15. Ушкалова В. Н., Иоанидис Н. В. // Вопр. мед. химии.— 1986.— № 6.— С. 129—131.
16. Ушкалова В. П., Иоанидис Н. В., Ибрагимова С. Н. и др. // Лаб. дело.— 1987.— № 6.— С. 446—450.
17. Ушкалова В. Н., Кадочникова Г. Д. // Бюл. экспер. биол.— 1987.— № 5.— С. 571—573.
18. Чазов Е. И., Лакин К. М. Антикоагулянты и фибринолитические средства.— М., 1977.
19. Bottigioni E., Facchini G. // Clin. ter.— 1956.— Vol. 10, N 5.— P. 571—578.
20. Kommerel B., Berger H. D. // Klin. Wschr.— 1960.— Bd 38, N 3.— S. 134—137.

Поступила 05.11.88

## HEMOCOAGULATION SHIFTS IN OPERATION TRAUMA AND EXOGENOUS THROMBOPLASTINEMIA AFTER TREATMENT WITH VITAMINS

S. L. Galyan, A. Sh. Byshevsky, V. M. Shafer, V. G. Solov'ev, S. N. Ibragimova

Chair of Biochemistry, Medical School, Tyumen.

Preadministration of vitamins A and E or A, E, C and P before laparotomy or exogenous thromboplastinemia (within 12 days) as well as administration of these vitamins simultaneously with vitamin PP within 2 days after the operation did not alter distinctly blood coagulation, while attenuated considerably the hemocoagulation shifts related to laparotomy or exogenous thromboplastinemia. The vitamin complex studied appears to be suitable for decrease of the postoperation hemocoagulation shifts.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1990

УДК 616.831.31-008.931-02:613.863]-092.9

В. П. Скурыгин, Е. П. Елизарова, Г. С. Куренная, Г. Н. Балденков

## АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНАЯ СИСТЕМА СИНАПТОСОМ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПРИ ОСТРОМ СТРЕССОРНОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Кафедра биохимии Запорожского медицинского института, Институт экспериментальной кардиологии ВКНИИ АМН СССР, Москва

Воздействия стрессорной природы приводят к изменениям в головном мозге обмена ряда нейротрансмиттеров [1, 7, 8, 24, 25], что наряду с другими причинами вызывает изменения рецепторного аппарата нейронов [20, 17] и связанной с ним системы вторичных мессенджеров [6, 21]. Подобные изменения могут оказывать влияние на поведенческие реакции, наблюдаемые после воздействия стрессорных факторов [11, 13]. В связи с ролью синаптической передачи в клеточных механизмах ассоциативного поведения [3, 10] нами в условиях перенесенного острого стресса на синапсах коры головного мозга крыс были изучены система  $\beta$ -адренорецептор — аденилатциклаза и гуанилатциклаза — ферменты, участвующие в регуляции уровней циклических нуклеотидов в нервных окончаниях.

### Методика

Опыты проведены на крысах-самцах линии Вистар. Эмоционально-болевой стресс воспроизводили, как описано в работе [27], в виде невроза тревоги, основу которого состав-

ляет конфликт между выработанным условным рефлексом избегания и безусловным электрошоковым раздражителем на протяжении 6-часового нахождения животных в специальной клетке. Через 42 ч животных декапитировали, кору мозга гомогенизировали в 0,32 М растворе сахаразы и выделяли фракцию «тяжелых» синапсом и синаптических мембран по методу [5, 18]. Суммарную активность растворимой и мембраносвязанной гуанилатциклазы в синапсах определяли по методу [19]. Активность гуанилатциклазы рассчитывали по разности содержания cGMP между исходным уровнем и после 15-минутной инкубации при 30 °С в среде, содержащей 50 мМ трис-HCl, pH 7,6, 10 мМ MnCl<sub>2</sub>; 10 мМ теофиллин, 1 мМ GTP и 0,1 % тритона X-100. Реакцию начинали внесением 10—30 мкг белка синапсом. После остановки реакции кипячением содержание cGMP определяли радиоиммунологическим методом с помощью наборов фирмы «Amersham». В выбранных пределах временная и концентрационная зависимость активности фермента были линейными. До начала определения активности аденилатциклазы и связывания [<sup>3</sup>H]-дигидроалprenолола ([<sup>3</sup>H]-DHA) синаптические мембраны после выделения хранили в жидком азоте на протяжении 7—10 дней. Активность аденилатциклазы определяли при содержании белка синаптических мембран 10—30 мкг в пробе. Инкубируемая в течение 10 мин при 37 °С смесь объемом 50 мкл содержала: 50 мМ трис-HCl, pH 7,4; 2 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,5 мМ cAMP; 0,5 мМ изобутилметилксантина; 0,1 мМ ATP; [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP (около 500 000 dpm в пробе); 0,1 мМ GTP; 20 мМ креатинфосфата; 0,2 мкг/мл креатинфосфокиназы. При определении изопротереностимулируемой активности аденилатциклазы в инкубационную смесь добавляли изопротеренол в конечной концентрации 5·10<sup>-5</sup> М. Образовавшийся [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] cAMP определяли по методу [28], связывание [<sup>3</sup>H]-DHA синаптическими мембранами по методу [12] с некоторыми модификациями. Инкубацию мембран (40—90 мкг белка в пробе) с [<sup>3</sup>H]-DHA проводили в среде общим объемом 500 мкл, содержащей 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, при 30 °С в течение 30 мин. Неспецифическое связывание определяли в присутствии 1·10<sup>-5</sup> М пропранолола. Реакцию останавливали путем добавления холодного (4 °С) буфера того же состава с последующей фильтрацией через фильтры GF/C («Whatman», Англия). Определение количества участков связывания [<sup>3</sup>H]-DHA и Kd проводили по методу Скэтчарда.

Содержание белка определяли по методу [14] при добавлении дезоксихолата [15]. При статистической обработке данных использовали критерий Стьюдента.

Определение cGMP проводили, используя: наборы «Cyclic GMP RIA kit»; [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-ATP, [<sup>3</sup>H]-DHA («Amersham», Англия); пропранолол, изопротеренол, ATP, трис-HCl, cAMP, MgCl<sub>2</sub> («Sigma», США); GTP, креатинкиназа, креатинфосфат («Boehringer», ФРГ); изобутилметилксантина («Calbiochem», США). Остальные реактивы производства «Реахим» (ч. д. а.). Сахарозу дополнительно очищали путем перекристаллизации из этанола.

### Результаты и обсуждение

Связывание [<sup>3</sup>H]-DHA синаптическими мембранами коры мозга крыс характеризовалось константой диссоциации, равной 1,1 нМ, что близко к данным, полученным другими авторами [2]. У интактных животных и животных, исследованных к концу 2-х суток после перенесенного стресса, достоверных изменений Kd не обнаружено (1,1 и 1,2 нМ соответственно). Учитывая отсутствие изменений этого показателя (рассчитанного с использованием объединенного белка синаптических мембран от 6 крыс из-за недостаточного количества мембранного материала), в дальнейшем мы ограничились определением только количества участков связывания [<sup>3</sup>H]-DHA при насыщающей концентрации лиганда 3·10<sup>-8</sup> М, как это делали и другие исследователи [23]. Этот показатель в отличие от Kd, является более вариабельным и снижается при хроническом стрессе [29] и вызванным им повышением концентрации агониста [9] либо в случае, если концентрация агониста увеличивается за счет его введения в систему [22].

Связывание [ $^3\text{H}$ ]-ДНА, активность аденилатциклазы во фракции синаптических мембран и активность гуанилатциклазы синапсом коры головного мозга крыс на 2-е сутки после перенесенного стресса ( $M \pm m$ )

Показатель	Контроль	Стресс
Число участков связывания [ $^3\text{H}$ ]-ДНА, ( $B_{\text{max}}$ )	334 $\pm$ 18 (6)	285 $\pm$ 30 (6)
Фмошь на 1 мг белка		
Аденилатциклаза, пмошь	51,3 $\pm$ 4,0 (5)	61,5 $\pm$ 6,7 (4)
сАМР на 1 мг белка в 1 мин	16,3 $\pm$ 2,0 (4)	18,3 $\pm$ 2,9 (5)
Гуанилатциклаза, пмошь сГМР на 1 мг белка в 1 мин		

Примечание. В скобках — число животных в группе.

Как видно из таблицы, через 42 ч после перенесенного 6-часового стресса не отмечалось достоверных изменений количества участков связывания [ $^3\text{H}$ ]-ДНА в синаптических мембранах коры мозга крыс. Отсутствие изменения числа  $\beta$ -адренорецепторов в первые минуты и через 10 ч после стресса показано и в других структурах головного мозга [29], что свидетельствует о стабильности этого показателя при острых стрессорных воздействиях.

При исследовании активности аденилатциклазы мы не обнаружили ее стимуляции под действием изопротеренола ни до, ни после стрессорного воздействия, что соответствует данным литературы. Предполагают, что гомогенизация мозга, осмотический шок и длительное центрифугирование при получении синаптических мембран приводят к потере чувствительности фермента к действию агонистов  $\beta$ -адренорецепторов [4, 26]. Базальная активность аденилатциклазы и суммарная активность растворимой и мембраносвязанной гуанилатциклазы в исследованных группах животных также не различались. Это может свидетельствовать либо об отсутствии изменения активности изученных ферментов нервных окончаний при остром стрессе, либо о нормализации их активности к концу 2-х суток после прекращения действия стрессогенных факторов. Можно предположить, что острые стрессорные воздействия реализуются не через систему циклических нуклеотидов, а через гормонзависимую регуляцию фосфолипазы С и изменение метаболизма фосфоинозитидов, а также через участие протеинкиназы С, регулирующей возбудимость различных нейронов [18].

Таким образом, можно заключить, что к концу 2-х суток после окончания стрессорного воздействия не происходит изменения  $\beta$ -адренорецепторов и ферментов, определяющих синтез сАМР и сГМР в нервных окончаниях коры головного мозга крыс.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Bowers M. B., Bannon M. J., Hoffman F. J. // Psychopharmacology. — 1987. — Vol. 93, N 1. — P. 133—135.
2. Bylund D. B., Snyder S. H. // Molec. Pharmacol. — 1976. — Vol. 12. — P. 568—580.
3. Byrne J. H. // Physiol. Rev. — 1987. — Vol. 67, N 2. — P. 329—439.
4. Davis J. N., Lefkowitz R. J. // Brain Res. — 1976. — Vol. 113. — P. 214—218.
5. De Robertis E., Pellegrino De Iraldi A., Ridrigues De Lores Arnaiz G., Salganicoff L. // J. Neurochem. — 1962. — Vol. 9. — P. 23—35.
6. De Lapaz R. L., Dickman S. R., Grosser B. I. // Brain Res. — 1975. — Vol. 85. — P. 171—175.
7. De Souza E. B., Van Loon G. R. // Ibid. — 1986. — Vol. 367, N 1—2. — P. 77—86.
8. Fatzanska M., Budal D., Oprsalova Z., Kvetnansky R. // Ibid. — 1987. — Vol. 424, N 1. — P. 109—114.
9. Irwin J., Ahluwalia P., Anisman H. // Ibid. — 1986. — Vol. 379, N 1. — P. 98—103.
10. Kandel E. R., Schwartz S. H. // Science. — 1982. — Vol. 218. — P. 433—443.
11. Katz R. J., Roth K. A., Carrol B. J. // Neurosci. Biobehav. Rev. — 1981. — Vol. 5, N 2. — P. 247—251.
12. Lefkowitz R., Mullicin D., Caron M. // J. biol. Chem. — 1976. — Vol. 251, N 15. — P. 4686—4692.
13. Levine S., Madden I. V. J., Conner F. L. et al. // Physiol. Behav. — 1973. — Vol. 10. — P. 467—471.
14. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
15. Maddy A. H., Spooner R. L. // Vox Sang. — 1970. — Vol. 18. — P. 34.
16. Miller R. // Trends Neurosci. — 1986. — Vol. 9, N 11—12. — P. 538—541.
17. Nukina I., Glavin G. B., La Bella F. S. // Brain Res. — 1987. — Vol. 401, N 1. — P. 30—33.
18. Rodriguez De Lores Arnaiz G., Alberici M., De Robertis E. // J. Neurochem. — 1967. — Vol. 14. — P. 215—225.
19. Steiner A. L., Pagliara A. S., Chase L. R., Kipnis D. M. // J. biol. Chem. — 1972. — Vol. 247, N 4. — P. 1114—1120.
20. Stone E. A. // Brain Res. — 1982. — Vol. 237. — P. 405—414.
21. Stone E. A. // J. Neurochem. — 1979. — Vol. 32. — P. 1335—1337.
22. Suzuki K., Sugiyama S., Takagi K. et al. // Biochem. Med. — 1987. — Vol. 37, N 2. — P. 157—166.
23. Takayama H., Mizukawa K., Ota Z., Ogawa N. // Brain Res. — 1987. — Vol. 436, N 2. — P. 291—295.
24. Thierry A. M., Javoy F., Glowinski J., Kely S. S. // J. Pharmacol. exp. Ther. — 1968. — Vol. 163. — P. 163—171.
25. Umori K., Tanaka M., Kohno Y. et al. // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1982. — Vol. 16, N 4. — P. 637—640.
26. Von Hungen K., Roberts S. // Europ. J. Biochem. — 1973. — Vol. 36. — P. 391—401.
27. Wald E. R., Mackinnon J. R., Desiderato O. // Physiol. a. Behav. — 1973. — Vol. 10, N 4. — P. 825—827.
28. White A. A. // Meth. Enzymol. — 1974. — Vol. 38. — P. 41—46.
29. Yocca F. D., Friedman E. // J. Neurochem. — 1984. — Vol. 42. — P. 1427—1432.

Поступила 05.11.88

#### THE ADENYLATE CYCLASE SYSTEM IN SYNAPTOSOMES OF RAT BRAIN CORTEX UNDER CONDITIONS OF ACUTE STRESS

V. P. Skurygin, E. P. Yelizarova, G. S. Kurennaya, G. N. Baldenkov

Chair of Biochemistry, Medical School, Zaporozh, Institute of Experimental Cardiology, All-Union Cardiological Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow.

Synaptosomes and synaptic membranes were studied in brain cortex of rats after 6 hrs emotional-painful stress. No alterations were observed in  $\beta$ -adrenoreceptors, adenylate and guanylate cyclases to the end of the second day after the acute stress action.