

ІСТОРІЯ БІОХІМІЇ

ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМУ ДІЇ ДЕЯКИХ ПСИХОТРОПНИХ РЕЧОВИН І СИСТЕМИ АКТИВНОГО ТРАНСПОРТУВАННЯ КАЛЬЦІЮ В НЕРВОВИХ КЛІТИНАХ В ІНСТИТУТІ БІОХІМІЇ НАН УКРАЇНИ (1960–1980 рр.)

Різні форми нервової діяльності пов'язані з тим, що між нервовим імпульсом і метаболізмом як у самій нервовій системі, так і в тих органах, які вона іннервує, існує нерозривний взаємозв'язок. Суттєва роль в регуляції метаболічних процесів належить речовинам, які утворюються внаслідок обміну речовин у нервових клітинах, тобто нейротропним речовинам ендogenousного походження. До них належить *серотонін (5-гідрокситриптамін)*, який виявляє дуже широкий діапазон дії на різні фізіологічні функції. Особливо важливою є його нейромедіаторна роль. Було відомо, що серотонін впливає на функції нервової, серцево-судинної, ендокринної і сечостатевої систем. Він також впливає на органи дихання, шлунково-кишковий тракт, печінку, селезінку. Тому його вважа-

ли не тільки нейромедіатором, але й одним із регуляторів внутрішньоклітинного обміну. Його функціональна активність виявляється у взаємодії з рецепторами синаптичних мембран і, тим самим, обумовлює трансмембранне переміщення іонів, а також зв'язані з цим подальші зміни в обміні речовин, але незважаючи на широкий діапазон його дії, конкретне місце серотоніну в складному ланцюзі регуляторних процесів не було з'ясовано. Розкриття механізму його дії як одного з нейромедіаторів і регулятора обміну речовин було актуальним завданням нейрохімії, яке мало не тільки теоретичне значення, але було важливим і для клінічної медицини. До розв'язання цих актуальних завдань долучилися і співробітники відділу біохімії нервової системи Інституту біохімії НАН України.



О. П. Готовцева, О. П. Козуліна, Я. Т. Терлецька, Н. М. Полякова, Л. С. Смерчинська, Н. І. Стрижова-Салова. V Всесоюзна конференція з біохімії нервової системи. Тбілісі, 1968 р.

Оскільки із джерел літератури було відомо, що серотонін впливає на біоенергетичні процеси, а універсальними акумуляторами енергії в живих організмах є нуклеозиди та трифосфати, то, перш за все, важливим було дослідити вплив серотоніну на вміст вільних нуклеотидів головного мозку. До вирішення цього питання першими долучилися **М. Д. Курський** і **О. М. Зряков** (1964 р.). Вони встановили, що *серотонін* у дозі 0,05 мг/кг, введений інтрацестернально за 1 год до досліду, підвищує вміст вільних нуклеотидів (АТР, АДР, ГТР) як у великих півкулях головного мозку кролів, так і в мозочку, знижуючи вміст неорганічного фосфату. *Іпразид* (антидепресант, інгібітор моноаміноксидази), введений підшкірно в дозі 100 мг/кг також за 1 год до досліду, не змінює вмісту АТР, АДР і неорганічного фосфату, але підвищує вміст ГТР у великих півкулях головного мозку; у мозочку вірогідних змін досліджених нуклеотидів не виявлено. *Автори дійшли висновку, що дію іпразиду, який застосовувався в медицині для лікування депресії, не можна пояснити лише накопиченням серотоніну в мозку тварин; механізм його дії складніший і потребує подальшого вивчення.*

У 1968 р. **О. М. Зряков** захистив кандидатську дисертацію «**Серотонин и обмен кислоторастворимых пуриновых нуклеотидов в ткани головного мозга**» (*науковий керівник канд. біол. наук М. Д. Курський*). Експериментальні дані, наведені в дисертаційній роботі свідчили, що під впливом серотоніну збільшується вміст аденіннуклеотидів (АТР, АДР, АМР) у тканині головного мозку кролів, насамперед у везикулах нервових закінчень.

У відділі біохімії нервової системи проводили всебічне дослідження впливу серотоніну та іпразиду на обмін речовин. Так, у 1965 р. **Л. С. Смерчинською** була захищена кандидатська дисертація на тему «**Влияние серотонина и ипразида на обмен белков центральной нервной системы**» (*науковий керівник акад. О. В. Палладін*). Дослідження було проведено на окремих внутрішньоклітинних структурах головного мозку кролів — ядрах, мітохондріях (важких і легких), мікросомах, розчинній цитоплазматичній фракції. Одержані результати показали, що одночасне введення іпразиду та екзогенного *серотоніну* призводить до істотнішого зниження інтенсивності включення ^{35}S -метіоніну як у сумарні протеїни, так і у протеїни окремих субклітинних структур головного мозку порівняно із введенням *серотоніну* та *іпразиду* окремо. Інтенсивність включення ^{14}C -лізину у протеїни півкуль

головного мозку, мозочка, довгастого мозку, варолієвого мосту, чотиригорбикового тіла і проміжного мозку у разі введення *іпразиду* знижується. Слід відмітити, що під впливом *серотоніну* та *іпразиду* підвищується проникність гематоенцефалічного бар'єра для ^{14}C -лізину і не змінюється для ^{32}S -метіоніну.

Дослідження вмісту і обміну низькомолекулярних біологічно активних речовин, які на той час широко проводилися в різних лабораторіях, привело до відкриття низки високоактивних нейротропних препаратів — *транквілізаторів* і *стимуляторів*, дія яких на функціональний стан центральної нервової системи обумовлена, в першу чергу, їхнім впливом на обмін біоактивних амінів головного мозку. Тому порівняльні дослідження впливу серотоніну та іпразиду на азотистий обмін, які проводилися у відділі біохімії нервової системи під керівництвом **О. В. Палладіна**, мали як теоретичну, так і практичну спрямованість. В цьому аспекті на увагу заслуговує захищена у 1964 р. кандидатська робота **Я. Т. Терлецької** «**Влияние ингибитора моноаминоксидазы—ипразидна на некоторые стороны азотистого обмена головного мозга животных**» (*науковий керівник акад. О. В. Палладін*).

Результати роботи показали, що введення *іпразиду* кролям як одноразово, так і протягом кількох днів знижує рівень *глутаміну*, але не впливає на вміст аміаку та амідних груп протеїну. Активність ензимів, які беруть участь в обміні глутаміну — *глутамінгідролази* і *глутамінсинтетази* — також не змінюється. Введена інтрацестернально глутамінова кислота підвищує оновлення амідних груп протеїнів головного мозку як контрольних, так і експериментальних тварин, в той час як *серотонін* не впливає на азотистий обмін головного мозку. З огляду на одержані результати, автор пропонує для лікування людей *іпразидом* використовувати, крім *вітаміну В₆*, ще й *глутамінову кислоту*.

За даними **В. Й. Кочерги** і **О. П. Готовцевої** (1967 р.) *іпразид* і *трансамін* за одноразового введення собакам у великих дозах та у малих за хронічного — призводить до значного зниження активності *моноаміноксидази* (МАО), яка окислює *серотонін*, і підвищенню вмісту *серотоніну* в головному мозку порівняно з контролем.

Вивчаючи фармакологічні властивості інгібіторів МАО, які на той час широко застосовувались для лікування депресивних станів, необхідно було враховувати особливості їхньої дії на активність МАО в різних відділах голов-

ного мозку. Дослідження, проведені **О. П. Готовцевою** у 1968 р., показали, що *трансамін* та *іпразид* у великих дозах сильніше пригнічують активність MAO середнього мозку собак, ніж зорових ділянок кори головного мозку. Низькі дози *трансаміну* знижували активність MAO середнього мозку, не впливаючи на активність зорових ділянок головного мозку. *Іпразид* у малих дозах не впливав на активність MAO досліджуваних ділянок.

Роботи з дослідження механізмів дії психотропних речовин одночасно проводились і в лабораторії біохімічної фармакології, яка у 1963–1968 рр. входила до складу відділу біохімії нервової системи і керівником якої був професор **С. І. Балуєв**. На основі проведених в ній порівняльних досліджень фармакологічної дії *іпразиду* та *трансаміну* було встановлено, що, незважаючи на те, що обидві речовини є інгібіторами MAO, показання до застосування їх у психіатричній практиці мають бути неоднаковими, насамперед тому, що вони є різними за своєю хімічною природою: *трансамін* впливає подібно до фенаміну, в той час як особливість дії *іпразиду* обумовлена, очевидно, його належністю до похідних гідразину. (**Н. І. Стрижова-Салова, С. І. Балуєв**, 1968 р.).

Крім того, у полі зору цієї лабораторії був антидепресант *індопан*, який діє як інгібітор MAO і який за своєю структурою є *α-метил-триптаміном*, близьким до структури *серотоніну*. Показано, що *індопан* впливає на вміст *норадреналіну* та *серотоніну* в різних ділянках головного мозку. Причому за умов перехресного кровообігу ці зміни вмісту *норадреналіну* та *серотоніну* спостерігаються лише у тварин, до головного мозку яких *індопан* не потрапляє, тобто він діє тільки на периферійні рецепторні системи (**С. І. Балуєв, Н. І. Стрижова-Салова, О. Г. Мінченко**, 1969).

У 70-ті роки ХХ ст. з'явилися роботи, в яких механізм дії *меліпраміну*, а також *антидепресантів* – *інгібіторів моноамінооксидази* – пов'язували зі здатністю цих препаратів гальмувати проникність *катехоламінів* через клітинні мембрани і спричинювати накопичення їх у нервових закінченнях. З метою перевірки цих даних під керівництвом акад. **О. В. Палладіна П. К. Пархомець** і **В. Й. Кочерга** (1970, 1971 рр.) провели дослідження і показали, що *меліпрамін* дійсно пригнічує поглинання екзогенного *серотоніну* фракцією нервових закінчень і синаптичними везикулами. Він гальмує також вивільнення *серотоніну* із фракції нервових закінчень під час інкубації останніх у фізіологічному середовищі. Резуль-

тати їхніх досліджень *in vivo* також свідчать про можливий гальмівний вплив *меліпраміну* на поглинання екзогенного *серотоніну* мозком щурів і кролів, що важливо для з'ясування фармакологічної дії *меліпраміну* як антидепресанта. Вони виявили певну кореляцію між зміною вмісту *серотоніну* і *5-оксііндолацтової кислоти* в різні проміжки часу після введення щурам *меліпраміну*. Введений *меліпрамін* призводить до зниження активності моноаміноксидази фракції нервових закінчень та мітохондріальної фракції.

Експериментальні дані, одержані за вивчення дії *меліпраміну* на обмін *серотоніну*, наведені **П. К. Пархомцем** у 1970 р. у кандидатській дисертації «*Изучение влияния мелипрамина на обмен серотонина в головном мозгу животных*» (*науковий керівник акад. О. В. Палладін*). Результати роботи свідчать про те, що фізіологічні ефекти, спричинені *меліпраміном*, можуть бути обумовлені його впливом на проникність мембран для *серотоніну*, а також порушенням дезамінування аміну, що призводить до підвищення його вмісту в нейронах щурів. Експериментальні дані, одержані на тваринах, дають можливість пов'язувати лікувальний антидепресивний ефект *меліпраміну* в людей зі змінами обміну *серотоніну* в головному мозку.

Під впливом *меліпраміну* в мозку щурів, яким попередньо вводили *резерпін*, зростає вміст *серотоніну* в 2,7 раза порівняно з тими тваринами, яким вводили лише *резерпін*. Введення *резерпінізованим* щурам *серотоніну* після попередньої ін'єкції *меліпраміну* супроводжується підвищенням вмісту аміну в мозку порівняно з його вмістом у щурів, яким вводили тільки *меліпрамін* (**О. П. Готовцева, П. К. Пархомець**, 1972 р.).

Подальші роботи, присвячені дослідженню впливу *серотоніну* на різні біохімічні показники у клітинних елементах нервової тканини, було проведено під науковим керівництвом **М. Д. Курського**. Показано, що інтрацистернально введений *серотонін* не впливає на інтенсивність споживання кисню, а зумовлює підвищення величини дихального коефіцієнта в мітохондріях великих півкуль, стовбура мозку та мозочку. Введений *серотонін* також не впливає на споживання кисню і окисне фосфорильовання в ядрах мозку. В той самий час введення *серотоніну* спричинює збільшення вмісту АТР, АДР, АМР і зниження неорганічного фосфату в мітохондріях головного мозку кролів, а також зниження кількості аденілової кислоти в розчинній фракції мозку.

Інтрацистернально введений *серотонін* є причиною значного підвищення активності *АТР-ази* гомогенатів і мітохондрій великих півкуль та стовбура мозку. Також спостерігається підвищення швидкості гідролізу ГТР у гомогенатах півкуль, стовбурі і в мітохондріях великих півкуль мозку та швидкості гідролізу ЦТР в гомогенатах мозку кролів. *Серотонін*, введений внутрішньочеревно, підвищує активність *АТР-ази* мітохондрій великих півкуль мозку тварин, але не впливає на активність нуклеозидтрифосфатаз ядер мозку. *Серотонін*, введений у велику цистерну головного мозку через 23 год після внутрішньочеревого введення ^{32}P , спричинює підвищення питомої радіоактивності АМР, АДР, АТР, а за одночасного інтрацистернального введення ^{32}P -*серотоніну* – також ГМР та ГТР. Крім того, він підвищує інтенсивність включення ^{14}C -1-гліцину в аденілові нуклеотиди мітохондріальної фракції головного мозку кролів (О. М. Федоров, Н. М. Гуленко, О. М. Зряков, 1968 р.).

Пізніше було встановлено, що *серотонін*, введений інтрацистернально (0,1 мг/кг), підвищує вміст глюкози й глікогену та знижує кількість молочної кислоти в головному мозку кролів. Кальцій, введений інтрацистернально (0,1 мг/кг), підвищує рівень глікогену, не змінюючи вміст глюкози і молочної кислоти. Під впливом *серотоніну* підвищується вміст глюкози та її радіоактивність за ацетатом у мозку кролів. Але амін не спричинює зміни рівня глікогену у мозку та його питомої радіоактивності за введення міченої глюкози (Н. М. Гуленко, Д. С. Сидоренко, 1969, 1972 рр.).

За експериментальними даними М. Д. Курського, О. М. Федорова і В. А. Тугая (1968–1970 рр.) *серотонін*, введений у велику цистерну головного мозку, стимулює включення ^{45}Ca у тканини головного мозку, сідничного нерва і спинного мозку. Авторадіографічне дослідження показало, що за інтенсивністю включення радіоактивного кальцію у відділи головного мозку під впливом *серотоніну* має місце перерозподіл іонів ^{45}Ca між різними відділами нервової системи. Якщо в контролі за рівнем радіоактивності вони розміщувались у такій послідовності: *таламус* > *гіпоталамус* > *довгастий мозок* > *кора великих півкуль* > *мозочок*, то під впливом *серотоніну* ця послідовність була такою: *гіпоталамус* > *кора великих півкуль* > *мозочок* > *довгастий мозок* > *таламус*. У досліджах *in vivo* встановлено, що під впливом інтрацистернального і внутрішньо-

венного введення *серотоніну* підвищується інтенсивність обміну $^{45}\text{Ca}^{2+}$ у фракціях *мітохондрій* та *синапсом* головного мозку. В досліджах *in vitro* показано, що *серотонін* стимулює вхід $^{45}\text{Ca}^{2+}$ у фракцію *синапсом*, а також вихід його з *мітохондріальної* та *мікросомної* фракції мозку.

Одержані експериментальні результати і дані літератури з цього питання було підсумовано в оглядовій статті М. Д. Курського і О. М. Федорова «*Серотонин и обмен веществ в организмах животных*» та опубліковано в журналі «Успехи современной биологии» (т. 67, в. 2, 1969 р.).

У 1970 р. на симпозиумі, присвяченому іонному транспорту через біологічні мембрани, М. Д. Курський і О. М. Федоров виступили з доповіддю «*Серотонин і транспорт іонів кальцію*», яку потім було опубліковано в «Українському біохімічному журналі» у 1971 р. (т. 43, № 1).

М. Д. Курський підсумував експериментальний матеріал у докторській дисертації «*Роль 5-окситриптамина (серотонина) в биоэнергетических процессах*», яку він захистив у 1971 р. в Київському державному (національному) університеті імені Тараса Шевченка.

Аналізуючи одержані експериментальні дані, М. Д. Курський дійшов висновку, що біохімічний механізм дії *серотоніну* на біоенергетичні процеси тісно пов'язаний з обміном і транспортуванням іонів кальцію в клітинах нервової системи. *Серотонін* стимулює включення іонів ^{45}Ca у фракцію *синапсом*, а також виведення його з *мітохондріальної* та *мікросомної* фракцій мозку.

У 1974 р. М. Д. Курський разом з М. С. Бакшеевим опублікували монографію «*Биохимические основы действия серотонина*» (К.: Наукова думка. – 296 с.), за яку були відзначені премією ім. О. В. Палладіна у 1976 р.

За цією ж тематикою у 1973 р. В. А. Тугаєм було захищено кандидатську дисертацію «*Изучение биохимического механизма медиаторного действия серотонина*» (науковий керівник – докт. біол. наук М. Д. Курський).

Експериментальні дані, наведені в кандидатській дисертації В. А. Тугая, свідчили про те, що під впливом *серотоніну* має місце перерозподіл полярних і неполярних груп протейнів на мембранах нервових закінчень, що є доказом їхніх конформаційних змін. Автор вважав, що підвищення вмісту ^{45}Ca в тканині головного мозку кролів під впливом *серотоніну* можливо обумовлено стимуляцією ним проникності плазматичних мембран для цього катіону.



М. Д. Курський, 1960 р.

Таким чином, дослідивши вплив *серотоніну* на транспортування іонів кальцію, зв'язування і вивільнення його клітинними і субклітинними мембранами тканини мозку в дослідах *in vitro* та *in vivo*, **М. Д. Курський, О. М. Федоров, В. А. Тугай** (1972, 1973 рр.) вирішили, що під впливом *серотоніну* підвищується рівень іонізованого кальцію завдяки стимуляції його транспортування крізь мембрани, а також вивільнення його із субклітинних структур (*мітохондрій* та *саркоплазматичного ретикулула*), що свідчить про участь Ca^{2+} в процесах передачі нервового збудження.

У 50–60 рр. ХХ ст. було встановлено важливу роль Ca^{2+} у виявленні великої кількості біохімічних і фізіологічних функцій, в тому числі і тих, які характерні для збудливих клітин, зокрема, для нервових клітин. Із джерел літератури було відомо, що зміна внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} призводить до змін і порушень процесів у нервових клітинах. Проникнення Ca^{2+} у клітини обумовлено функціонально, в той самий час підвищення його концентрації вище певного рівня ($\sim 10^{-7}$ М) призводить до блокування здатності клітин збуджуватись. Все це свідчить про наявність у нервовій системі механізму підтримки концентрації іонізованого Са на певному рівні. Тому одним із питань в дослідженні функціональної та регуляторної ролі Ca^{2+} в нервових клітинах було виявлення систем, здатних регулювати внутрішньоклітинну концентрацію вільного

кальцію. У клітинах скелетних м'язів цю функцію виконує, головним чином, саркоплазматичний ретикулум, а в еритроцитах — плазматична мембрана. Система регуляції концентрації іонізованого кальцію в нервових клітинах була досліджена недостатньо. Невідомою була участь внутрішньоклітинних структур у цьому процесі; зовсім нічого не було відомо про участь ядра і синаптичних пухирців. Виключно важливе для біохімії нервової тканини питання про системи і механізми регуляції внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} залишалось фактично не вивченим.

Тому одним із напрямів досліджень у відділі біохімії нервової системи Інституту біохімії у 70-і роки був пошук систем активного транспортування Ca^{2+} в субклітинних структурах нервової системи та вивчення їхніх властивостей і механізмів дії, розпочаті **Н. М. Поляковою** і продовжені **С. О. Кудіновим**.

Основним об'єктом було обрано фракцію *синаптосом*, оскільки вони є єдиною структурою нервових клітин, де є плазматична мембрана. Із джерел літератури було відомо, що підтримання розподілу Ca^{2+} потребує витрати енергії та наявності механізмів його видалення у внутрішньоклітинний простір. Було також відомо, що такою Ca^{2+} -транспортувальною системою і є Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-аза, яку пізніше почали називати «кальцієвою помпою».

Під час дослідження АТР-азної активності синаптичних пухирців, виділених із сірої речовини великих півкуль головного моз-



С. О. Кудінов, О. В. Палладін, Н. М. Полякова, Я. В. Белік. V Всесоюзна конференція з біохімії нервової системи. Тбілісі, 1968 р.

ку великої рогатої худоби, було визначено умови, які є оптимальними для дії АТР-ази, зокрема: необхідність іонів Mg і Ca, оптимальна концентрація препарату ензиму, час інкубації, склад і концентрація буфера, температура, рН середовища. Тоді ж було показано, що Na^+ , K^+ -АТР-аза у препараті синаптичних пухирців відсутня, тому що за наявності Mg^{2+} ензим не є чутливим до азиду натрію (NaN_3) і слабо гальмується La^{3+} у відносно високих концентраціях. Саме ці властивості свідчили про те, що це є інша АТР-аза, яка відрізняється від АТР-ази мітохондрій. Синаптичні пухирці не містять актоміозинподібної та аналогічної ензимові саркоплазматичного ретикулула Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-ази, яка бере участь у транспортуванні кальцію. АТР-аза синаптичних пухирців активується також іонами Mn, Co, Zn. Іони Ba, Sr, Fe до певних концентрацій не впливають на активність ензиму, а у високих — гальмують її; іони Cu пригнічують активність ензиму. Одновалентні катіони у присутності Mg^{2+} гальмують активність цієї АТР-ази. За наявності іонів Mg АТР-аза синаптичних пухирців гідролізує ЦТР, ГТР і УТР на 20–35% по відношенню до АТР. Ензиматична система фракції синаптичних пухирців гідролізує АДР, ЦДР і УДР відповідно на 40, 25 і 20%, а АМР,

ГМР, ЦМР і УМР — приблизно такою самою мірою, як і АТР. Збільшення здатності низки іонів металів (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) активувати ензим у разі використання АТР як субстрату супроводжується підвищенням специфічності до нього порівняно з іншими нуклеозидтрифосфатами. Сульфідгідрильні реагенти (N-етилmaleїнімід, p-хлормеркурібензоат, салірган) інактивують АТР-азу синаптичних пухирців, проте в усіх випадках спостерігається залишкова активність, незалежно від концентрації цих реагентів (Н. М. Полякова, С. О. Кудінов, Н. К. Харченко, 1973 р.).

Наведені вище експериментальні дані було узагальнено у 1974 р. Н. К. Харченко в кандидатській дисертації «АТФ-азная активність фракції синаптичних пухирців» (наукові керівники: докт. біол. наук Н. М. Полякова, канд. біол. наук С. О. Кудінов). Основним висновком із цієї роботи було наступне. Виходячи з одержаних даних, що свідчать про відсутність Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-азної активності у фракції синаптичних пухирців, а також про те, що в них не накопичується $^{45}\text{Ca}^{2+}$ і не утворюється проміжне фосфорильоване похідне, можна вважати, що в синаптичних пухирцях відсутня система транспортування Ca^{2+} , подібна до саркоплазматичного ретикулула.

Дослідження властивостей Mg^{2+} -залежної, Ca^{2+} -активованої АТР-ази плазматичних мембран *синапсом* із сірої речовини великих півкуль великої рогатої худоби, які було проведено під керівництвом **С. О. Кудінова**, показали, що іони Ca є необхідними для вивільнення синаптичних медіаторів і, можливо, вони потрапляють у пресинаптичне нервове закінчення під час вивільнення медіатору. У середовищі без Mg^{2+} іони Ca активують ензим дещо менше, ніж іони Mg . Максимальна активація АТР-ази кальцієм спостерігається за наявності 6,0–10,0 мМ Mg^{2+} , а для Mg^{2+} -АТР-ази достатньо 1 мМ Mg^{2+} . Найвищу активність Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-аза виявляє при рН 7,3–7,6, в той час як рН оптимум активності Mg^{2+} -АТР-ази – 8,0 і вище. Оптимальна температура для виявлення активності Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-ази становить 35–45 °С; Mg^{2+} -АТР-аза є більш термостійкою. KCl або $NaCl$ активують Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-азу, а Mg^{2+} -АТР-аза мало чутлива до зростання концентрації цих сполук (**Є. М. Макогоненко**, 1973 р.).

Пізніше було встановлено, що Mg^{2+} -залежна, Ca^{2+} -активована АТР-аза плазматичних мембран *синапсом* із сірої речовини великої рогатої худоби є тіловим ензимом. *Салірган*, *n*-ХМБ, *N*-етилмалеїнімід (NEM) повністю пригнічують активність цього ензиму. Ефективне запобігання інгібуванню здійснює АТР у концентраціях, оптимальних для виявлення активності ензиму (**Є. М. Макогоненко**, **Т. В. Гриненко**, 1974 р.). *На цій підставі дійшли висновку, що в активному центрі цієї АТР-ази містяться SH-групи. Виявлено кореляцію між активністю ензиму і кількістю SH-груп, які не зазнали впливу сульфгідрильних реагентів за наявності різних концентрацій АТР.*

Дослідження Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -активованої АТР-ази фракції мікросом із сірої речовини великих півкуль великої рогатої худоби показало, що цей ензим має низку спільних властивостей із ензимом саркоплазматичного ретикулула (**І. Р. Алексеєнко**, **Є. М. Макогоненко**, 1974 р.). *Автори припускають, що ця АТР-аза є складовою частиною системи мікросом мозку, яка транспортує кальцій.*

Детальніше дослідження ролі SH-груп для проявлення активності Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -активованої АТР-ази фракції мікросом із сірої речовини великих півкуль головного мозку великої рогатої худоби показало, що різні SH-реагенти в певних концентраціях майже повністю пригнічують активність цього ензиму, а АТР захищає ензим від інактивуючої дії NEM, що свідчить про схожість дослідженого ензиму з Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-азою саркоплаз-

матичного ретикулула (**І. Р. Алексеєнко**, **С. О. Кудінов**, 1975 р.).

Дослідження АТР-ази ядер клітин мозку кролів показало, що вона у 3–4 рази більше активується іонами Mg і в 2–2,5 рази іонами Ca ; Na^+ , K^+ -АТР-азу в препаратах ядер мозку не виявлено. У присутності Mg^{2+} ензим інгібується іонами Na , K , Li ; оптимум його рН активності становить 8,0–8,4; температурний оптимум спостерігається при 45 °С. Азид натрію та La^{3+} гальмують активність АТР-ази, а NEM інгібує її на одну третину. Mg^{2+} чи Ca^{2+} -АТР-ази ядер нервових клітин подібні за властивостями відповідним ензимам синаптичних пухирців, мікросомної фракції мозку та плазматичних мембран *синапсом* (**Л. М. Глебова**, **І. Р. Алексеєнко**, 1974 р.).

Екстрагуванням фракції плазматичних мембран *синапсом* 0,15–0,20%-им розчином дигітоніну одержано солюбілізований препарат Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-ази, який розділявся в 7,5% поліакриламідному гелі на 8–10 електрофоретичних зон. Mg^{2+} -залежну, Ca^{2+} -активовану АТР-азу солюбілізували також із фракції мікросом великих півкуль головного мозку великої рогатої худоби, обробляючи її 0,1–0,4%-ми розчинами дигітоніну. Солюбілізований протеїн виявляв Mg^{2+} - та Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-азну активність. Одержані результати свідчили про подібність Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-ази фракції мікросом мозку до відповідних ензимів саркоплазматичного ретикулула і плазматичних мембран *синапсом* (**Є. М. Макогоненко**, **І. Р. Алексеєнко**, 1975 р.).

У 1975 р. **Є. М. Макогоненко** захистив кандидатську дисертацію на тему: « **Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-азная активність фракції плазматических мембран *синапсом***» (науковий керівник – канд. біол. наук **С. О. Кудінов**).

У висновках роботи стверджувалось, що фракція плазматичних мембран *синапсом* кори головного мозку великої рогатої худоби в умовах інгібування Na^+ , K^+ -АТР-ази строфантинном K виявляє Mg^{2+} -залежну Ca^{2+} -активовану АТР-азну активність. За своїми властивостями цей ензим подібний до такого саркоплазматичного ретикулула і еритроцитів, зокрема за реакцією на одновалентні катіони; за чутливістю до SH-реагентів; за здатністю АТР захищати його від NEM, що може свідчити про наявність сульфгідрильної групи в активному центрі цього ензиму. Як і ензим саркоплазматичного ретикулула, Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-азу *синапсом* можна також солюбілізувати. *Ця подібність властивостей дає підстави вважати, що Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТР-аза *синапсом* є також Ca^{2+} -транспортувальною системою.*

У 1977 р. **І. Р. Алексеєнко** захистив кандидатську дисертацію на тему: «**Mg²⁺, Ca²⁺-АТФ-азная активність и транспорт Ca²⁺ во фракції мікросом мозгу**» (науковий керівник — канд. біол. наук **С. О. Кудінов**). Метою роботи було з'ясування загального механізму транспортування Ca²⁺ у фракції мікросом мозку, дослідження властивостей Mg²⁺-залежної Ca²⁺-активованої АТФ-ази і порівняння їх із відомими аналогічними ензимними системами, участь яких доведена в процесі активного транспорту Ca²⁺. Кореляція властивостей дослідженої Mg²⁺, Ca²⁺-АТФ-ази із властивостями АТФ-залежного зв'язування ⁴⁵Ca²⁺ у фракції мікросом мозку свідчить про те, що процес активного транспортування кальцію в цій фракції відбувається, можливо, за участю цього ензиму, який є компонентом Ca²⁺-транспортувальної системи ендоплазматичного ретикулула нервової клітини.

Дослідження деяких властивостей Mg²⁺, Ca²⁺-АТФ-ази фракції мікросом і плазматичних мембран синапсом сірої речовини великих півкуль мозку великої рогатої худоби в солюбілізованому стані виявило, що активність обох ензимів підвищується за додавання іонів кальцію; температурний оптимум їхньої активності в межах 40–45 і 35–42 °С відповідно, а рН-оптимум для обох ензимів знаходиться в межах 7,0–7,3. Солюбілізація

Mg²⁺, Ca²⁺-АТФ-аз із фракції мікросом мозку та плазматичних мембран синапсом істотно не впливає на їхні властивості (**Є. М. Макогоненко** і **І. Р. Алексеєнко**, 1978 р.).

У подальшому було встановлено, що *ацетат лантану* в концентрації 5·10⁻⁵ М повністю пригнічує активність Mg²⁺, Ca²⁺-АТФ-ази у фракції плазматичних мембран синапсом із сірої речовини великих півкуль мозку бика. *Рутенієвий червоний* і *гексамінокобальт* у концентрації 10⁻⁴ М знижують активність ензиму на 50–60%, а *меліпрамін*, *аміназин*, *верапаміл* в концентраціях 10⁻⁶–10⁻⁴ М і олігоміцин у концентрації 0,01–5,0 мкг в 1 мл не впливають на неї. За цих концентрацій *ацетат лантану* може бути використаний як інгібітор Mg²⁺-залежної Ca²⁺-активованої АТФ-ази плазматичних мембран у тому разі, якщо не можна використати ЕГТА (**Т. В. Гриненко**, 1978 р.).

Таким чином, результати роботи, одержані **Т. В. Гриненко**, **Є. М. Макогоненком** (1978 р.) під керівництвом **С. О. Кудінова**, свідчили про наявність процесу активного накопичення кальцію замкненими фрагментами плазматичних мембран синапсом, який, можливо, відбувається з утворенням проміжного фосфорильованого похідного і пов'язаний з роботою Mg²⁺, Ca²⁺-АТФ-ази.

У 1979 р. **Т. В. Гриненко** захистила кандидатську дисертацію «**АТФ-зависимое накопление**



В. В. Новохатній, С. О. Кудінов, Т. В. Гриненко в лабораторії. Київ, 1978 р.

Ca²⁺ и Mg²⁺, Ca²⁺-АТФ-азная активність фракції плазматических мембран синапсом» (науковий керівник — канд. біол. наук С. О. Кудінов). Результати проведеної роботи дали можливість дійти висновку, що Mg²⁺, Ca²⁺-АТФ-аза бере участь в активному транспортуванні кальцію крізь мембрани нервових закінчень подібно до Са-транспортувальних систем в еритроцитах і саркоплазматичному ретикулумі. Зроблено припущення про можливий загальний механізм активного переміщення Ca²⁺ крізь мембрани біологічних структур.

Пошук систем активного транспорту Ca²⁺ у субклітинних структурах нервових клітин (ядрах, синаптичних пухирцях, мітросомній фракції, фракції плазматичних мембран синапсом), дослідження їхніх властивостей та механізму дії було метою докторської дисертації С. О. Кудінова «Системы транспорта Ca²⁺ в субклеточных структурах нервных клеток», яку він захистив у 1979 р.

А у 1983 р. вийшла монографія С. О. Кудінова «Системы транспорта кальция в нервных клетках» (К: Наукова думка. — 158 с.), за яку у 1985 р. він був удостоєний звання лауреата премії імені О. В. Палладіна. В цій монографії висвітлено результати досліджень субклітинних структур, що зв'язують іони кальцію в нервовій клітині, і механізм їхнього перенесення через плазматичні мембрани синапсом. Доведено наявність кальцієвої помпи у плазматичних мембранах нервових закінчень, в яких виявлено Ca²⁺, Mg²⁺-АТФ-азу та систему Mg²⁺-АТФ-залежного транспортування кальцію; встановлено кореляцію між властивостями ензиму і кальцій транспортувальним механізмом.

На основі даних літератури і одержаних С. О. Кудіновим із співробітниками було створено уявлення про системи, які регулюють концентрації іонізованого кальцію в нервових клітинах. У внутрішньоклітинному зв'язуванні Ca²⁺ беруть участь ендоплазматичний ретикулум, мітохондрії, синаптичні пухирці та Са-зв'язувальні протеїни. В ендоплазматичному ретикулумі зв'язування Ca²⁺ відбувається за участю кальцієвого насоса (помпи), який регулює концентрацію іонізованого кальцію клітин в межах фізіологічних концентрацій. Мітохондрії можуть включатись у цей процес, можли-

во, у разі сильного підвищення концентрації іонізованого кальцію.

Участь синаптичних пухирців, в яких немає кальцієвого насоса (помпи), у Са-зв'язувальних процесах обумовлена, імовірно, присутністю в них значної кількості АТФ, а адсорбований в синаптичних пухирцях Ca²⁺ виводиться в синаптичну щілину. Таким чином, синаптичні пухирці можуть не тільки брати участь у зв'язуванні внутрішньоклітинного Ca²⁺, але бути одночасно системою для виведення його із клітини.

Наявність в нервових клітинах протеїнів, які мають високу спорідненість до Ca²⁺ свідчить про можливість їхньої участі в регуляції рівня іонізованого кальцію. Ці протеїни можуть регулювати рівень Ca²⁺ в межах його фізіологічних концентрацій, а також реалізовувати регуляторну роль у зміні рівня іонізованого кальцію.

Включно важливим є з'ясування механізму виведення Ca²⁺ з нервових клітин у позаклітинний простір. Нервові клітини відрізняються від інших наявністю аксону і інтрааксонного току. Виведення Ca²⁺ з інтрааксонним током з нервових клітин в аксон і нервові закінчення, можливо, пов'язано з відсутністю або малою потужністю системи виведення Ca²⁺ через плазматичну мембрану нервової клітини. Виведення Ca²⁺ відбувається крізь плазматичну мембрану синапсом за участю кальцієвого насоса, про що свідчили експериментальні дані С. О. Кудінова і співробітників.

На сьогодні вважається, що іони кальцію, як і циклічні нуклеотиди (с-АМР і с-ГМР) є вторинними месенджерами в клітинах нервової тканини. Вони трансформують позаклітинні сигнали, носіями яких є первинні месенджери (нейромедіатори, гормони, нервові імпульси), в каскад регуляторних внутрішньоклітинних процесів. Роль іонів кальцію як вторинних внутрішньоклітинних месенджерів у багатьох випадках обумовлена зв'язуванням їх із регуляторними протеїнами. Вони також впливають на метаболізм нервових клітин, регулюючи фосфорилування протеїнів мозку.

Наприкінці слід зауважити, що на початку 80-х років у відділі біохімії нервової системи Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна було завершено дослідження Ca²⁺, Mg²⁺-АТФ-азних систем, роль яких полягає в підтриманні на мембрані нейронів градієнта іонів кальцію.

Р. П. Виноградова, В. М. Данилова

В роботі використано матеріали наукової бібліотеки Інституту біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України.

Список вибраних публікацій, які використано під час написання статті

1. Курський М. Д., Зряков О. М. Вплив серотоніну на вміст вільних нуклеотидів у тканині головного мозку кролів // Укр. біохім. журн. – 1964. – Том XXXVI, № 5. – С. 679–684.
2. Терлецкая Я. Т. Влияние ингибитора моноаминоксидазы – ипразида на некоторые стороны азотистого обмена головного мозга животных / Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1964. – 17 с.
3. Смерчинская Л. С. Влияние серотонина и ипразида на обмен белков центральной нервной системы / Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1965. – 20 с.
4. Кочерга В. Й., Готовцева О. П. Вплив іпразиду і трансаміну на активність моноаміноксидази та вміст моноамінів у головному мозку собак і кролів // Укр. біохім. журн. – 1967. – Том 39, № 2. – С. 125–129.
5. Зряков О. Н. Серотонин и обмен кислоторастворимых пуриновых нуклеотидов в ткани головного мозга животных / Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1968. – 18 с.
6. Готовцева О. П. Вплив трансаміну та іпразиду на активність моноаміноксидази середнього мозку і зорових часток кори головного мозку // Укр. біохім. журн. – 1968. – Том 40, № 1. – С. 7–10.
7. Курський М. Д., Федоров О. М., Гуленко Н. М. Вплив серотоніну на окисне фосфорилування в субклітинних фракціях різних відділів головного мозку і печінки кролів // Там само. – С. 11–16.
8. Зряков О. М. Кислоторозчинні нуклеотиди субклітинних фракцій головного мозку і печінки та вплив серотоніну на їх вміст // Там само. – С. 22–26.
9. Курський М. Д., Гуленко Н. М., Федоров О. М. Вплив серотоніну на активність нуклеозидтрифосфатгідролаз головного мозку і печінки кролів // Там само. – № 2. – С. 135–139.
10. Стрижова-Салова Н. І., Балуєв С. І. Вплив малих доз трансаміну на вміст аміаку, глутаміну, амідного азоту білків у головному мозку собак // Там само. – № 3. – С. 261–264.
11. Зряков О. М., Курський М. Д. Вплив серотоніну на включення R^{32} і гліцину- $1-C^{14}$ в кислоторозчинні нуклеотиди мітохондрій головного мозку кролів // Там само. – № 6. – С. 549–552.
12. Гуленко Н. М., Курський М. Д. Вплив серотоніну на вміст глікогену, глюкози та молочної кислоти в головному мозку кролів // Там само. – 1969. – Том 41, № 4. – С. 353–355.
13. Балуев С. И., Стрижова-Салова Н. И., Минченко А. Г. Влияние индопана на содержание биогенных аминов и на активность холинэстеразы в головном мозге собак / Второй Всес. биохим. съезд. Тезисы докладов. – Ташкент, 1969. – Секція 21. – С. 52.
14. Курский М. Д., Федоров А. Н. Серотонин и обмен веществ в организме животных // Успехи современной биологии. – 1969. – Том 67, Вып. 2. – С. 190–200.
15. Пархомец П. К., Палладін А. В., Кочерга В. Й. Вплив меліпраміну на поглинання серотоніну тканиною мозку тварин // Укр. біохім. журн. – 1970. – Том 42, № 6. – С. 687–691.
16. Пархомец П. К. Изучение влияния мелипрамина на обмен серотонина в головном мозгу животных / Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1970. – 26 с.
17. Пархомец П. К., Кочерга В. Й. Вплив меліпраміну на обмін серотоніну в головному мозку щурів // Укр. біохім. журн. – 1971. – Том 43, № 3. – С. 275–278.
18. Курский М. Д. Роль 5-окситриптамина (серотонина) в биоэнергетических процессах / Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Киев, 1971. – 44 с.
19. Готовцева О. П., Пархомец П. К. Вплив меліпраміну на вміст серотоніну в мозку резерпінізованих щурів // Укр. біохім. журн. – 1972. – Том 44, № 1. – С. 105–107.
20. Гуленко Н. М., Курський М. Д., Сидоренко Д. С. Вплив серотоніну на включення радіоактивної мітки в глюкозу і глікоген мозку та м'язів матки кролів при введенні ацетату- $2-C^{14}$ і глюкози- $1,6-C^{14}$ // Там само. – № 4. – С. 479–482.
21. Тугай В. А. Изучение биохимического механизма медиаторного действия серотонина / Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1973. – 21 с.
22. Харченко Н. К., Кудінов С. О., Полякова Н. М. Нуклеотидгідролізуюча активність синаптичних пухирців та вплив на АТФ-азу

- сульфгідрильних реагентів // Укр. біохім. жрн. – 1973. – Том 45, № 5. – С. 581–586.
23. Кудінов С. О., Макогоненко Є. М. Mg^{2+} -залежна, Ca^{2+} -активована АТФ-аза плазматичних мембран синапсом // Там само. – № 6. – С. 712–717.
 24. Харченко Н. К., Кудінов С. О. Дослідження системи транспорту Ca^{2+} у фракції синаптичних пухирців // Там само. – 1974. – Том 46, № 1. – С. 57–61.
 25. Макогоненко Є. М., Гриненко Т. В., Кудінов С. О. Вплив SH-реагентів на активність Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -активованої АТФ-ази плазматичних мембран синапсом // Там само. – № 5. – С. 553–560.
 26. Алексєєнко І. Р., Кудінов С. О., Макогоненко Є. М. Mg^{2+} -залежна Ca^{2+} -активована АТФ-азна активність фракції мікросом мозку // Там само. – № 6. – С. 707–711.
 27. Глебова Л. М., Алексєєнко І. Р., Кудінов С. О. Аденозинтрифосфатазна активність у ядрах клітин мозку // Там само. – С. 712–718.
 28. Алексєєнко І. Р., Кудінов С. О. SH-групи і Mg^{2+} -залежна Ca^{2+} -активована АТФ-азна активність фракції мікросом мозку // Там само. – 1975. – Том 47, № 1. – С. 49–54.
 29. Макогоненко Є. М., Кудінов С. О., Алексєєнко І. Р. Солюбілізація Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -активованої АТФ-ази фракції плазматичних мембран синапсом // Там само. – С. 55–60.
 30. Макогоненко Є. М. Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФ-азна активність фракції плазматичних мембран синапсом / Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Киев, 1975. – 23 с.
 31. Кудінов С. О., Алексєєнко І. Р., Макогоненко Є. М. Солюбілізація Mg^{2+} -залежної Ca^{2+} -активованої АТФ-ази фракції мікросом мозку // Укр. біохім. жрн. – 1975. – Том 47, № 6. – С. 714–718.
 32. Кудінов С. О., Алексєєнко І. Р. До питання про механізм транспорту іонів кальцію у фракції мікросом мозку // Там само. – 1977. – Том 49, № 1. – С. 68–72.
 33. Алексєєнко І. Р. Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазна активність и транспорт Ca^{2+} во фракции микросом мозга / Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1977. – 22 с.
 34. Кудінов С. А., Макогоненко Є. М., Алексєєнко І. Р. Некоторые свойства Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФ-аз фракций микросом мозга и плазматических мембран синапсом в солюбилизованном состоянии // Укр. биохим. жрн. – 1978. – Том 50, № 1. – С. 53–56.
 35. Гриненко Т. В., Кудінов С. А. Влияние веществ, угнетающих транспорт ионов, на Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФ-азную активність плазматических мембран синапсом // Там же. – № 5. – С. 631–633.
 36. Кудінов С. О., Гриненко Т. В., Макогоненко Є. М. Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФаза і накопичення Ca^{2+} фракцією плазматичних мембран синапсом // Доповіді АН УРСР, сер. Б. – 1978. – № 8. – С. 748–750.
 37. Гриненко Т. В. АТФ-зависимое накопление Ca^{2+} и Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазная активність фракции плазматических мембран синапсом / Автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Киев, 1979. – 23 с.
 38. Кудінов С. А. Системы транспорта Ca^{2+} в субклеточных структурах нервных клеток / Автореф. дис. ... степени докт. биол. наук. – Киев, 1979. – 45 с.
 39. Кудінов С. А. Системы транспорта Ca^{2+} в нервных клетках. – Киев: Наук. думка, 1983. – 160 с.

Отримано 01.07.2011