АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О.БОГОМОЛЬЦЯ

На правах рукопису

П Р У Д Н І К О В Ігор Михайлович

РЕГУЛЯЦІЯ РЕЦЕПЦІЇ ДОФАМІНУ В ТКАНИНАХ ЦЕНТРАЛЬНОЇ НЕРВОВОЇ СИСТЕМИ МОЛЮСКА LYMNAEA STAGNALIS.

Спеціальність:
Біофізика - 03.00.02

А в т о р р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

К И Ї В - 1994

Робота виконана в Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця АН України

Науковий керівник - доктор біологічних наук Кононенко Н. И.

Офіційні опоненти :

доктор біологічних наук Веселовський М. С.
канд. біологічних наук Слінченко Н. М.

Провідна установа - Інститут фізіології Київського Університету ім. Тараса Шевченка

Офіційний захист дисертації відбудеться « 27 » квітня 1994 р. на зас спеціалізованої ради Д-016.15.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Бого АН України за адресою м. Київ, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна познайомитися в бібліотеці Інституту фізі ім. О. О. Богомольця АН України

Автореферат розісланий « » 1994 р.

Вчений секретар
спеціалізованої ради
доктор біологічних наук З. О. Сорокіна-Маріна

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

АКТУАЛЬНІСТЬ ПРОБЛЕМИ. Більшість процесів міжнейронної сигналізації обумовлено діяльністю великого сімейства трансмембранних глікопротеїнів, здатних розпізнавати і зв'язувати медіаторні речовини, а також взаємодіяти з ГТФ-зв'язуючими регуляторними білками (G-білками). Активація трансмембранних рецепторів впливає на здатність G-білків змінювати активність ферментів та провідність іонних каналів.

Функціонування білків, які зв'язуються з ГТФ і здійснюють координацію дії позаклітинних передатчиків з ефекторними системами, регулюється за допомогою різних механізмів. Частіше за все вивчаються зміни в активності G-білків, до яких приводять ковалентні модифікації амінокислотних залишків цих протеїнів при їхньому фосфорилюванні або рибозилюванні (34,46,50,58) В останні роки з'явилась характерна тенденція до вивчення аллостеричної регуляції G-білків як білковими регуляторами (кальмодулін)і, так і більш простими сполуками : гуаніновими нуклеотидами та іонами магнію (33,42) Багаточисельні регуляторні феномени обумовлені в біологічних системах на молекулярному рівні ковалентною модифікацією білків. Серед такого роду модифікацій переважає одна - фосфорилювання /дефосфорилювання/. Фосфорилювання за участю цАМФ-залежної протеїнкінази А (ПКА), протеїнкінази С, кінази β-адренорецепторів призводить до зменшення ефекту дії нейромедіаторів, при цьому фосфорилюванню піддаються рецептори (4, 6,29,37), іонні канали (58, 97, 102), G-білки (92, 107). Рецептори нейромедіатора дофаміна (ДА) в тканинах хребетних тварин часто використовуються як модель десенситізації (29, 66). Дослідження пластичності т8рансмембранної сигналізації з участю дофамінових рецепторів на класичних нейробіологічних моделях - нейронах молюсків - також досить багаточисельні, але проведені в більшості випадків з використанням непрямих електрофізіологічних підходів (71, 99). Значно менше досліджено у молюсків пластичність нейрональної трансмісії за допомогою прямих біохімічних тестів.

В запропонованому дослідженні за об'єкт обрано прісноводного молюска *Lymnaea stagnalis* (великий п'явушник). В його ендокринних клітинах , що продукують інсуліно-подібний гормон росту, електрофізіологічними методами охарактеризовані дофамінові рецептори,

подібні $Д_1$ та $Д_2$ рецепторам хребетних тварин (98, 108, 110). Описано також збільшення чутливості $Д_2$ рецепторів до дофаміну в культурі цих клітин (109, 110) та модулювання інгібітором фосфодіестераз іонної провідності, індукованої дофаміном в нейроендокринних клітинах.

ЦІЛІ ТА ЗАВДАННЯ: мета проведеної роботи полягала в тому, щоб більш детально дослідити механізми пластичності трансмембранної дофамінової сигналізації у молюсків з використанням електрофізіологічних та біохімічних методів. Для досягнення цієї мети були поставлені такі завдання:

1) Вивчити вплив ДА на іонну провідність в мембранах нейроендокринних клітин, що продукують інсуліно-подібний фактор росту. Дослідити десенситізацію відповідей на ДА в умовах електрофізіологічного експерименту та вплив на цей процес змін концентрації внутрішньоклітинного 3',5'-циклічного аденозин-монофосфату (цАМФ).

2) Дати характеристику впливу ДА на активність аденілатциклази в мембранній фракції, одержаній з нейронів ЦНС молюска.

3) Вивчити рецепцію ДА мембранними рецепторами в нервовій тканині молюска та вплив на регуляцію цього процесу ендогенних модуляторів активності G-білків - гуанінових нуклеотидів та іонів магнію.

4) Дослідити вплив цАМФ-залежного фосфорилювання на взаємодію ДА рецепторів з відповідними їх G-білками та аденілатциклазою.

НАУКОВА НОВИЗНА. Показано, що дофамін в ЦНС п'явушника зв'язується з двома типами мембранних рецепторів. Це викликає зміни в іонній провідності нейрональних мембран, а також призводить до ГТФ-залежної активації та інгібуванню аденілатциклази. Наведені процеси супроводжуються підвищенням активності ГТФ-зв'язуючих білків. Доведено, що наявність гуанінових нуклеотидів веде до зменшення афінності однієї з популяцій рецепторів ДА та підсилює спорідненість рецепторів до антагоністів в другій популяції. Виявлено, що цАМФ-залежне фосфорилювання нейрональних мембран підсилює стимуляцію активності аденілатциклази ГТФ-зв'язуючими білками, зменшує швидкість викликаного дофаміном ГТФ ⟷ ГДФ обміну та інгібує ГТФ-залежне збільшення афінності рецепторів до ДА.

ПРАКТИЧНЕ ЗНАЧЕННЯ. Одержані результати можуть бути використані для створення та вивчення нових фармакологічних препаратів, які або безпосередньо зв'язуються з дофаміновими рецепторами або впливають на його рецепцію.

АПРОБАЦІЯ РОБОТИ. Матеріали дисертації доповідались та обговорювались на загальноінститутських семінарах сектору нейрофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця АН України (Київ 1922).

ОБ'ЄМ ТА СТРУКТУРА ДИСЕРТАЦІЇ. Дисертація складається з вступу 8 глав огляду літератури, описання методик та експериментів, обговорення одержаних результатів, п'яти висновків та списку використаної літератури з 115 першоджерел. Робота викладена на 105 сторінках друкованого тексту, ілюстрована 23 малюнками.

МЕТОДИКА

1. Тварини і матеріали.

Досліди проводили на тканині навкологлоткового нервового кільця молюсків *Lymnaea stagnalis* (Mollusca, Pulmonata). Електрофізіологічні досліди проводили на клітинах , що продукують інсуліно-подібний гормон росту (КГР), які ідентифікували в церебральному ганглії відповідно критеріям, запропонованим в роботах голандських дослідників (47, 54, 108, 110). Для вивчення відповідей на дофамін (ДА-відповідей) в КГР в експериментах використовували метод фіксації потенціалу і реєстрації трансмембранного струму.

Оцінка умов одержання мембранних препаратів проводилась за допомогою морфологічних та біохімічних методів. Для морфологічних експериментів використовували флюоресцентний мікроскоп, за допомогою якого ідентифікували клітини, з ядрами розміром 2-3 мкм. Для ідентифікації клітинних ядер застосовували фарбник Bisbenzimide H 33342 (Serva, Німеччина), який, зв'язучись з ДНК, утворює флюоресцентний продукт, який випромінює в зеленій області спектру. Зазор між стінкою скляного гомогенізатора і тефлоновим пестиком, вибирали такий, щоб, кількість зовні непошкоджених, гліальних клітин в осаді після центрифугування була найбільша. Оптимальний, розмір зазору складав 10-12 мкм, при цьому клітини крупних розмірів (нейрони) в інтактному стані в осаді не знаходились.

Виділені мембранні фракції з мозку молюсків, що використовувались для радіолігандного аналізу (65) заморожували при -60 С і використовували за необхідністю (65). Мембрани, що потрібні були для вивченя активності аденілатциклази виділяли згідно з (25) та використовували протягом 3 часів. Для характеристики виділених мембраних препаратів визначали в них активність маркерних ферментів та наявність рецепторів медіаторів за зв'язуванням міченого ДА,

активності гормон-залежної аденілатциклази (АЦ), Ca^{2+}, $Na^{+}K^{+}$ -залежної АТФази (відповідно до запису, який наведений в Практикумі по біохімії під редакцією С.Е.Северіна та Г.А.Соловйової, // Москва, МГУ 1989 с 35-391).

Для вивчення зв'язування мічених лігандів з мембранами, препарат мембран інкубували в темряві при 4 С в 110 мкл суміші: Tris-HCl або МОФС-NaOH, 50 ммоль/л, аскорбінова к-та 0,1 мг/мл або метабісульфат на 0,2 мг/мл, ЕГТА 2 ммоль/л, серотонін 100 мкмоль/л або катансерін 25 мкмоль/л, [^{3}H] SKF 38393 або [7,8 ^{3}H] дофамін в різних концентраціях, 0.01% луброла WX. Кількість білка в пробі в різних експериментах була від 7 до 30 мкг.

При дослідженні фосфорилювання 250-300 мкг мембранного білку преінкубували у 0,02% розчині луброла WX в 0,5 мл слідуючого розчину (в ммоль/л): буфер (МОФС або Tris) pH 7.2 - 50, АТФ (АффNHф в контролі) - 3 , $MgCl_2$ - 0.8 , 0.5 - 5 мкг на пробу каталітичної субодиниці цАМФ - залежної протеїнкінази (ПКА) (з активністю 41 - 240 нмоль/мкг фермента), окадеінової кислоти-0.02, ЕГТА - 2 , протягом 10 хв при 28 °С (14). Реакцію зупиняли 10-кратним розбавленням охолодженим буфером.

Для визначення активності препарату ПКА використовувався метод ,який був запропонований в роботі (14).

В експериментах з застосуванням антитіл мембрани попередньо інкубувались з імуноглобулінами протягом 60-90 хвилин на льоду. За контроль бралася нормальна сироватка того ж розбавлення. Антитіла кролика в концентрації 6 мг/мл (фракція IgG) були одержані до синтетичного пептиду з такою амінокислотною послідовністю: NH_2-Ala Asn Asn Leu Arg Gly Cys Glu Leu Tyr-COOH (345-354 консервативних амінокислотних залишків $G_o\alpha$ хребетних тварин) та до суміші $\beta_1+\beta_2$ нативних субодиниць G-білків (18). Препарати антитіл вироблені фірмою NEN (США) та люб'язно надані нам проф. В.А.Ткачуком (ВКНЦ, Москва).

Активність АЦ визначали за накопиченням цАМФ, відповідно методу, запропонованому Соломоном з співавт (86).

ГТФазна активність визначалась в системі, яка описана в роботах (20, 43)

При вивченні мембранної ГТФазної активності фосфорилювання мембран каталітичною субодиницею ПКА проводилось при наявності 0.5 ммоль/л АТФγS, 2 ммоль/л $MgCl_2$ і 1 - 3 мкг ПКА.

Зв'язування ГТФ-α-^{32}P проводилось в пробі,що містила мембранний

білок - 450 - 500 мкг; Тріс-HCl буфер 50 ммоль/л, pH = 7,4; ЕГТА 2 ммоль/л; ДТТ 1 ммоль/л; 0,5 • 10^5 - 1 • 10^5 імп/хв радіоактивної мітки; БСА 0,1 мг/мл; ГТФ 5 мкмоль/л; 100 мкмоль/л АМФФНФ ; АТФ - регенеруючу систему; Тритон Х-100 0.02% (82). Інкубація проходила при 30°С протягом 30 хв, після чого в суміш додавався ДА (в кінцевій концентрації 10 мкмоль/л) і ГТФγS (5 мкмоль/л) або тільки ГТФγS (82). В окремих дослідах використовувалась КПКА. Склад і кількість радіоактивних гуанінових нуклеотидів вивчалась за допомогою тонкошарової хроматографії (3).

Після внесення ГТФγS проба фільтрувалась через фільтр Whatman GF/C.

Кількість гуанозин ди- та трифосфатів визначали спектрофотометрично за рівнем поглинання при довжині хвилі 252 нм, pH 7.0 і є рівним 13700 для 1 моль/л речовини.

Кількість білка визначали за методом Лоурі (23).

РЕЗУЛЬТАТИ

I. ДА-індуковані струми в клітинах, що виділяють гормон росту.

Спираючись на літературні дані (47, 99, 108-111), ми намагалися застосовуючи електрофізіологічі методи, знайти $Д_1$ та $Д_2$ рецептори ДА в ЦНС *Lymnaea* Для цього використовувались розташовані в церебральному ганглії КГР (47, 54).

Приблизно в половині випадків, апплікація ДА (250 мкмоль/л) на клітини КГР викликала появу вхідних струмів (Мал. 1), в інших - вихідних (Мал. 1). Нечасто удавалось зареєструвати двофазну відповідь. Електричні відповіді клітин на ДА залежали від концентрації ДА в мікропіпетці Аналіз вольт-амперних характеристик цих струмів (ВАХ) свідчить про те,що потенціал реверсії вихідного струму дорівнює приблизно -90 мВ, та є близьким до рівноважного потенціалу для K^+, вхідного: між -10 та -5 мВ (Мал. 1). Останнє значення може свідчити про те, що канали, які активуються ДА та відповідають за виникнення вхідного струму або не селективні до іонів натрію та калію, або має місце одночасна активація провідностей для різних іонів.

Вихідні ДА-струми зворотньо блокувалися антагоністом сульпіридом (100 мкмоль/л). Аплікація агоніста ДА - 6,7-АДТН (50 мкмоль/л) - приводила до появи вхідного струму. На відміну від дії ДА, 6,7-АДТН вже при повторній аплікації викликав більш довгий за часом струм, на фоні якого наступні аплікації не приводили до виникнення вхідних

струмів (вихідний струм не досліджувався) (Мал. 2). Такий ефект агоністу ДА може вказувати на розвиток десенситизації, яка обумовлена прикладанням нейротрансміттера.

Для більш детального вивчення процесу десенситизації аплікації ДА проводились одразу ж після виходу на початковий рівень струму, який виник в результаті попередньої аплікації. Як правило, після третьої-четвертої аплікації медіатору амплітуда відповіді зменшувалась на 30-40 %. За таких умов десенситизація вхідних струмів при частому прикладанні ДА не спостерігалась (Мал.2).

Щоб з'ясувати можливий вплив зміни рівня цАМФ на ДА-струми в мембранах КГР, ДА апікували на нейрони з інтервалом 100 хвилин (для попередження десенситизації) в присутності 100 мкмоль/л інгібітору фосфодіестераз - ІБМК. Ефект ІБМК - пригнічення як вхідних, так і вихідних (Мал. 1 а, б) струмів - був зворотнім та розвивався на 3-й хв, досягаючи свого максимального значення на 20 хв. ВАХ ДА-струмів в присутності ІБМК демонстрували відсутність змін потенціалу реверсії струму. Цей факт свідчить на користь того, що іонна природа ДА-струмів не змінювалась, якщо в розчині Рінгеру був присутній інгібітор фосфодіестераз.

II. Вивчення властивостей аденілатциклази.

1. Виділення плазматичних мембран.

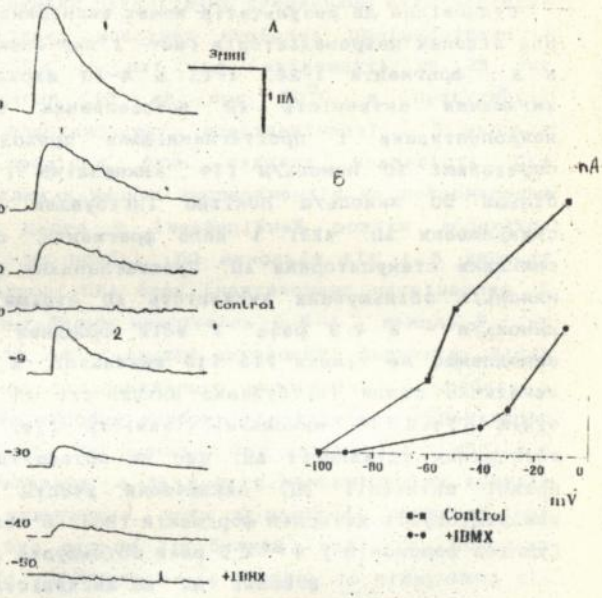
Якість фракціонування тканевого гомогенату в результаті диференціального центрифугування оцінювали, міряючи активність в різних фракціях центрифугата трьох ферментів: Na^+K^+-, CA^{2+}- залежних АТФаз і аденілатциклази (в перерахунку на мг. білка за хв.). Знайдено, що 65% активності Na^+K^+-залежної АТФази, відносно активності цього фермента у всьому клітинному гомогенаті, припадає на фракцію мембранн. Активність CA^{2+}-залежної АТФази спостерігалась в супернатанті (58%) і в мембранній фракціях (9%). Фракція гомогената, з непошкодженними клітинами, ядра, глію і шматки тканини, одержані після першого центрифугування, містила біля 25% тотальної активності Ca^{2+}-залежної АТФази.

Активність АЦ, стимульована фторидом алюмінію також реєструвалась, головним чином, в мембранній фракції: більше 50% від загальної активності.

Питоме специфічне зв'язування тритованого ДА і SKF 38393 з препаратами різних фракцій було найбільшим в мембранній фракції і майже повністю було відсутнє в супернатанті. Кількість питомого

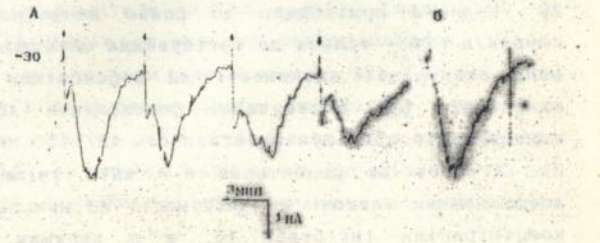
Мал. 1.

Вихідні струми в клітинах, які продукують інсулініподібний гормон росту (КГР), викликані апликацією дофаміна.
а. Вихідні струми при різних підтримуючих потенціалах (показані зліва, мВ) : 1 - контроль; 2 - після 20 хв суперфузії розчином з 1,4-ізобутил 2-метил-ксантином (ІБМК) (0,1 ммоль/л). Концентрація ДА 0,25 ммоль/л. б. Вольт-амперні характеристики (ВАХ) вихідних струмів в контролі (1) і після дії ІБМК (2).



Мал. 2.

Вхідні струми в КГР, викликані трьома послідовними аплікаціями дофаміну (б.- через 20 хв. після послідових аплікацій)



тотального зв'язування мітки з «гліальною» фракцією гомогената досягало рівня загального зв'язування з мембранною фракцією, але специфічне зв'язування в цьому випадку складало лише 5-10% від такої ж величини для мембранної фракції.

2. Загальні властивості мембранної аденілатциклази.

Відповідно до результатів наших експериментів, в мембранах *Lymnaea* ряд відомих нейромедіаторів (met- і leu-енкефаліни; простагландіни E_1 и E_2; фрагменти 1-24, 1-13 и 4-10 адренокортикотропіна - АКТГ) змінювали активність АЦ дозозалежним шляхом. Всі досліди з нейропептидами і простагландінами проводились при наявності в середовищі 10 мкмоль/л ГТФ. Енкефаліни і морфін в концентраціях більше 50 мкмоль/л помітно інгібували, а в меншій кількості, стимулювали АЦ. АКТГ і його фрагменти, особливо 4-10, виявились сильними стимуляторами АЦ. Простагландини E_1 и E_2 в концентрації 5 мкмоль/л збільшували активність АЦ більше ніж в два рази, а 10 мкмоль/л - в 4.3 раза. У всіх випадках додавання в інкубаційне середовище не тільки ГТФ (10 мкмоль/л), а і ГДФβS (1-10 мкмоль/л) викликало повне інгібування активності АЦ. Внесення в інкубаційну суміш ГТФγS (5 мкмоль/л), замість ГТФ, призводило до чіткого збільшення активності АЦ, але не потенціювало дію медіаторів. Для прямої активації АЦ, виключаючи участь рецепторів і G-білків, використовують дитерпен форсколін (90). В мембранних препаратах з ЦНС *Lymnaea* форсколін у 4 - 4,5 рази збільшував активність АЦ.

3. Вплив ДА на активність АЦ.

Базальна активність АЦ зростала із збільшенням концентрації ГТФ: при 10, 25 и 100 мкмоль/л ГТФ активність АЦ складала відповідно : 2,7; 5 и 7,9 пмоль/хв.мг білка. ДА мав подвійний вплив на активність фермента. Інгібуюча або стимулююча дія ДА залежала від концентрації ГТФ. При концентрації ГТФ рівної 10 мкмоль/л, внесення в пробу ДА у всіх випадках тільки стимулювало АЦ, збільшення концентрації ГТФ до 25 мкмоль/л призводило до появи двофазної відповіді на ДА 100 мкмоль/л ГТФ - тільки до інгібування активності АЦ. Вплив ДА був і на фоні стимуляції активності АЦ форсколіном або його аналогом (50 мкмоль/л). При активуванні форсколіном АЦ, ДА в присутності 1 мкмоль/л ГТФ збільшував активність АЦ, 100 мкмоль/л - зменшував (мал. 2). Агоніст ДА рецепторів 6.7 АДТН змінював активність АЦ ГТФ-дозозалежним шляхом: в присутності 25 мкмоль/л ГТФ 6.7 АДТН в малих концентраціях інгібував АЦ, а в великих - стимулював; при 100

мкмоль/л ГТФ спостерігалась тільки інгібуюча дія 6.7 АДТН. Дія ДА на активність АЦ блокувалась d-LSD (5 мкмоль/л) -, який є відомим агоністом рецепторів катехол- і індоламінів як у хребетних тварин (76), так і у молюсків (28).

4. Вплив фосфорилювання на активність АЦ

Для вивчення впливу фосфорилювання на ГТФ-залежну регуляцію активності АЦ ДА використовували каталітичну субодиницю цАМФ-залежної протеїнкінази (ПКА). В таких дослідах мембрани преінкубували з каталітичною субодиницею ПКА (7 пит. од. активності на 25 мкг мембранного білка) протягом 10 хв при 30°С в присутності АТФ-регенеруючої суміші (креатинфосфат- креатинкіназа) і 5 ммоль/л $MgSO_4$. В контрольних дослідах була вивчена можливість ПКА фосфорилювати мембранні білки в умовах експериментів на нейрональних мембранах молюсків. Для цього у інкубаційний розчин добавляли АТФ-γ-^{32}P ($1X10^6$ розп./хв. на пробу), 50 мкмоль/л АТФ і 5 ммоль/л $MgSO_4$. В негативному контролі ПКА була інактивована нагріванням. В присутності ПКА в мембранні білки включалось 0.5-0.3 пкмоль P_i/ мг мембранного білка за хв. на одну одиницю активності фермента. Після інактивування ПКА включення радіоактивного неорганічного фосфату в білки не знайдено Після обробки мембран каталітичною субодиницею ПКА базальна активність АЦ при 100 мкмоль/л ГТФ зменшувалась до 43% ∓ 9% відносно контрольної величини, а ДА у всіх концентраціях впливав на активність АЦ тільки стимулююче, хоча в контролі вплив ДА при таких концентраціях ГТФ був тільки інгібуючим (мал. 3). Оскільки базальний рівень активності зменшувався ~ в 2 раза, то стимулююча дія ДА на АЦ ледь досягала контрольного базального рівня.

5. Вплив фосфорилювання на гормон-незалежну активацію АЦ

Активність АЦ в присутності 100 мкмоль/л ГТФ і AlF^{4-} в мембранних препаратах збільшувалась в 7 - 8 разів (мал. 4 е) (базальна активність 7,9 пкмоль/хв.мг білка прийнята за 100 %). Якщо мембрани преінкубували з каталітичною субодиницею ПКА а потім вносили AlF^{4-}, то в цих умовах активність АЦ зростала до 2000 - 2300% (мал. 4 в). В випадку додавання фториду алюмінію до початку фосфорилювання, ефект AlF^{4-} в умовах фосфорилювання мембран зменшувався (мал. 4 д). Для негативного контролю процесу фосфорилювання в інкубаційну суміш під час преінкубації в розчин замість АТФ добавляли його аналог що негідролізується АМФФНФ (50 мкмоль/л), він не є інгібітором АЦ, і також не служить субстратом в реакції фосфорилювання, яку каталізує

ПКА (6). В контролі активність АЦ при наявності AlF^{4-} та каталітичної субодиниці ПКА незначно відрізнялась від такої в експерименті, де використовувався тільки фторид алюмінію (мал. 4 б, в, г).

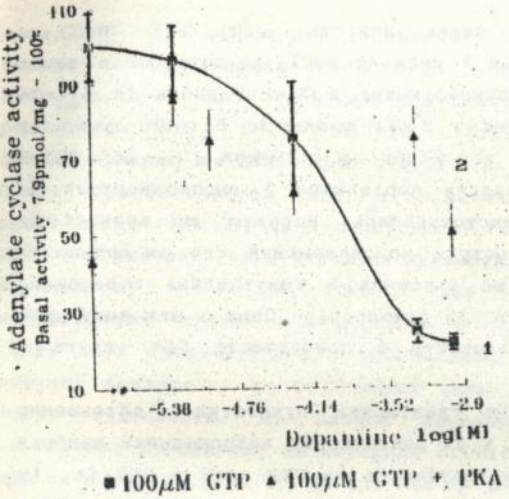
III. Зв'язування лігандів ДА рецепторів з нейрональними мембранами.

Специфічна рецепція [7,8 ^{3}H] ДА та [^{3}H] SKF 38393 мембранними рецепторами з нервової тканини молюска представлена як різниця між тотальним та неспецифічним зв'язуванням в присутності 200 мкмоль/л ДА. Неспецифічне зв'язування досягало 20% від рівня тотального, при цьому більша частина цієї кількості припадалала на зв'язування тритієвої мітки з матеріалом фільтрів. Специфічне зв'язування характеризувалось насиченням, в той час як неспецифічне було лінійним.

1. ГТФ-залежна рецепція агоністів ДА рецепторів.

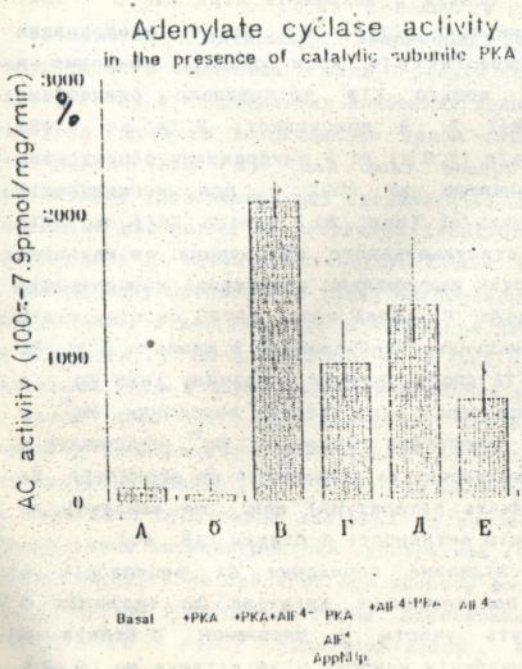
Вивчення ролі G-білків в регуляції рецепції ДА та його агоніста [^{3}H] SKF 38393 здійснювали за допомогою поліклональних антитіл до консервативної амінокислотної послідовності COOH-термінали α субодиниці G_o - білку та антитіл до нативних β_1 і β_2 субодиниць G - білків, а також в присутності різноманітних гуанінових нуклеотидів та іонів Mg^{2+} (18, 26, 39).

Виявлено, що при концентрації [^{3}H] SKF 38393 0.03-0.1 ммоль/л та 2 ммоль/л ЕГТА додавання до інкубаційного середовища гуанінових нуклеотидів викликало збільшення зв'язування ліганду. Збільшення концентрації [^{3}H] SKF 38393 до 1.5 ммоль/л приводило до того, що ГТФ (і особливо ГДФ), а також їх аналоги інгібували зв'зування мітки з ДА рецепторами мембран. Максимальний ефект інгібування проявляли аналоги ГДФ та ГТФ, що негідролізуються, а також ГДФ; при цьому інгібування досягало ~ 70 %. ГТФ виявився менш ефективним. АМФ, АДФ та ГМФ ніяк не впливали на зв'язування ліганду $Д_1$ рецепторів. В присутності Mg^{2+} зв'язування [^{3}H]-SKF 38393 зменшувалось дозозалежним шляхом (максимально при 5 ммоль/л $MgCl_2$ на 40 - 45 %). Серед речовин, які зв'язуються α-субодиницею G-білків, найбільший інгібуючий вплив на зв'язування [^{3}H] - SKF 38393 проявлявся з боку AlF^{4-} (2 ммоль/л NaF _ 50 мкмоль/л $AlCl_3$), який зменшував специфічне зв'язування на ~ 90 %. Ми зробили спробу з'ясувати ефект різнонаправленого впливу гуанінових нуклеотидів на зв'язування агоністів ДА з рецепторами в порівнянні з відомими літературними даними (18) за допомогою аналізу зв'язування в системі координат Скетчарда. Однозначного рішення задачі ця спроба



Мал. 3.

ДА-залежна активність в присутності каталітичн субодиниці протеінкінази (кПКА). Активність міряла при концентрації ГТФ 1 мкмоль/л, активність кПКА 240 пмоль / мг.сек (7 м кПКА / 25 мкг мембранно білку). 1 - активність бе 2 - в присутності кПКА.



Мал. 4.

Діаграма відноси значень AlF^{4-} залежноіактивності АЦ присутності кПКА і 1 мкмоль/л ГТФ.

По горизонталі: а котроль; б-е - п додавані:б - кПКА; в спочатку кПКА, а пот AlF^{4-}; г - спочатку кПКА, потім AlF^{4-} + АМФФNHФ (1 мкмоль/л); д - при умові спочатку AlF^{4}, потім кПК е - AlF^{4-}: по вертикалі активність по відношенню базального рівня (7 пмоль /мг /хв), прийнято за 100 %.

не принесла, але з'явилася певна ясність: [^{3}H] SKF 38393 в присутності 200 мкмоль/л ГДФ та 2 ммоль/л $MgCl_2$ зв'язується з двома популяціями ДА рецепторів: високоафінними з K_D=1.1 нмоль та B_{max}=34 фмоль/мг белку і низькоафінними з K_D=31 нмоль та B_{max}=170 фмоль/мг білку. Наявності бівалентного характеру зв'язування [^{3}H] SKF 38393 достатньо, для того, щоб провести порівняння з експериментами де гуанінови нуклеотиди не використовувались. Нагадаю, що агоніст ДА рецепторів в цьому разі демонструє моновалентний тип зв'язування. Доцільно було б припустити, що внесення в інкубаційне середовище ГДФMg викликає появу двох популяцій рецепторів. Одна з цих популяцій збільшує свою афінність до агоністу в присутності ГДФ, друга - зменшує.

При вивченні залежного від гуанінових нуклеотидів збільшення зв'язування тритієвих лігандів з ДА рецепторами нейрональних мембран в запропонованій роботі використовувались як ГТФ, так і ГДФ та їх аналоги, які негідролізуються. Внесення в інкубаційне середовище ГТФ в концентраціях від 10^{-3} до 10^{-7} моль/л в незначній мірі (на 5 - 15%) інгібувало зв'язування 2 нмоль/л [7,8 ^{3}H] ДА з мембранними рецепторами при всіх концентраціях ГТФ крім однієї. Введення в інкубаційне середовище 10^{-6} моль/л ГТФ збільшувало специфічне зв'язування медіатора на 28±7 %. В присутності ЕГТА та ГДФβS специфічне зв'язування 2 нмоль/л [7,8^{3}H] ДА з мембраннними рецепторами значно збільшувалось (максимально до 250% - при концентрації гуанінового нуклеотиду 10^{-5} моль/л) (Мал. 6). Заміна ЕГТА на ЕДТА викликала пригнічення ГДФβS-стимульованного збільшення зв'язування [7,8 ^{3}H] ДА та приводила до зсуву максимально сфективної концентрації аналогу ГДФ з 10^{-5} до 10^{-6} моль/л. Подібний сфект ГДФβS спостерігався і під час зв'язування з нейрональними мембранами 0.8 нмоль/л [^{3}H] SKF 38393. Беручи до уваги, що ЕГТА слабо хелатує з розчину іони Mg^{2+}, а зв'язування агоніста $Д_1$ рецептора інгібується внесенням Mg^{2+} в інкубаційне середовище, можна припустити існування Mg^{2+} компоненту в ГТФ-(ГДФ)-залежній регуляції афінності ДА рецепторів до агоністів. На користь цього твердження свідчать літературні дані, що вказують на залучення іонів Mg^{2+} в регуляцію активності G-білків (18, 40).

Для більш детального дослідження спряження ДА рецепторів з G-білками використовувались поліклональні антитіла до нативних G (β_1+β_2) субодиниць, що беруть участь у спряженні G-білків з рецепторами (18). Попередня інкубація мембран з антитілами до (β_1+β_2)

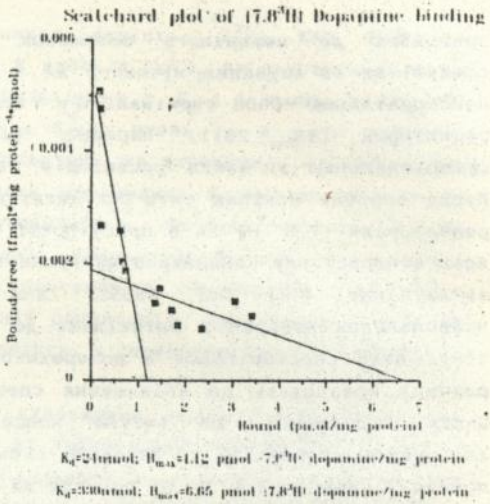
приводила до незначного зменшення здатності ГДФβS збільшувати специфічне зв'язування міченого ДА в присутності ЕГТА. Антитіла до консервативної -COOH термінали $G_o\alpha$ (ділянка G-білку, яка взаємодіє з рецептором (18, 26)), напевно, більш адекватні при вивченні функціональних зв'язків рецепторів та ГТФ-зв'язуючих білків (39). Після обробки мембран анти-$G_o\alpha$ антитілами специфічне зв'язування ДА рецепторами [7,8 ^{3}H] ДА в присутності ГДФβS наочно збільшувалось при всіх використаних концентраціях нуклеотиду (Мал. 6). При специфічному зв'язуванні [^{3}H] SKF 38393, яке вивчалось після інкубації нейрональних мембран з антитілами до $G_o\alpha$, ефект ГДФβS був подібний тому, який спостерігався в попередньому випадку: наявність ГДФβS в розчині призводить до збільшення специфічного зв'язування ліганду. Варто відзначити, що висока концентрація ГДФβS (10^{-3} моль/л) інгібувала специфічне зв'язування агоністу ДА, що не спостерігалось при зв'язуванні [7,8 ^{3}H] ДА при тих же умовах.

2. Вплив фосфорилювання на ГТФазну активність та ГДФβS- залежне зв'язування.

Збільшення активності мембранних ГТФаз супроводжує активацію рецепторів та спряжених з ними G-білків (18, 33). Базальна активність різних ГТФаз в нейрональних мембранах молюска складала 5.1±1 пмоль/мг білку/хв. Дофамін дозозалежним чином збільшував активність ГТФаз в 4-5 разів (Мал. 8). Цей факт вказує на втягування в процес ДА-залежної трансмембранної сигналізації G-білків. Після попередньої інкубації мембран з каталітичною субодиницею ПКА практично повністю інгібується ДА-залежна активність ГТФаз. Базальна ГТФазна активність в мембранному препараті в таких експериментах зменшувалась до 61% від контрольного рівня (на мал. 8 базальний рівень в контрольному досліді та в досліді з використанням ПКА взятий за 100%). Щоб з'ясувати, чи являється ГТФ в даних експериментальних умовах субстратом для кПКА, а також для того, щоб запобігти негативного впливу (враховуючи характер експерименту) мембранних протеінфосфатаз, АТФ в розчині був замінений на АффNHф або АТФγS в тій же концентрації, що і АТФ. АффNHф не являється субстратом для кПКА та мембранних фосфатаз і може бути використаний як конкурентний субстратний інгібітор цих ферментів (6). АТФγS підходить як субстрат для процесу фосфорилювання в тій же мірі, що і АТФ, але тіофосфатна група, перенесена на амінокислотний залишок субстратного білку протеінкіназой не доступна для дії протеінфосфатаз.

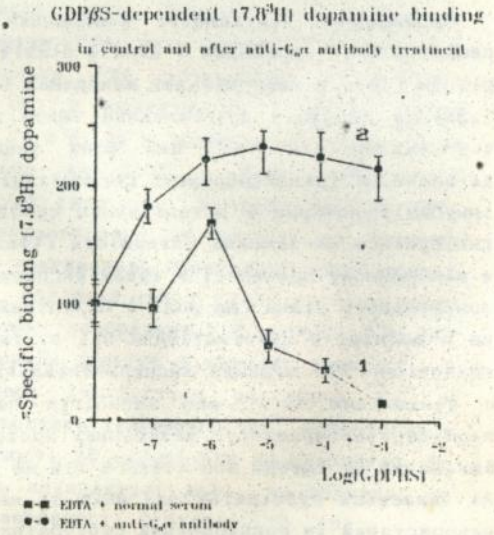
Мал. 5.

Зв'язування [7,8^{3}H] дофаміна з нейрональними мембранами п'явушника в координатах Скетчарда.



Мал. 6.

ГДФβS-залежне специфічне зв'язування з мембранами [7,8^{3}H] дофаміна в концентрації 2 ммоль/л після обробки мембран антитілами, одержаними проти консервативної амінокислотної послідовності $G_o\alpha$ субодиниці 1 - в присутності ЕДТА (2 ммоль/л), після обробки нормальною сироваткою кроля; 2 - в присутності ЕДТА (2 ммоль/л), після обробки мембран антитілами, одержаними проти $G_o\alpha$ субодиниці G-білків.



Експерименти показали, що заміна АффNHф на АТФγS під час попередньої інкубації в контрольних експериментах (без ПКА) помітно не впливала на ДА-залежну і базальну ГТФазну активність (Мал. 8). В дослідах по вивченню впливу цАМФ-залежного фосфорилювання на ГДФ-залежне зв'язування ДА та його агоністу з мембранними рецепторами, мембранні білки фосфорилювались каталітичнною субодиницею ПКА після обробки анти-$G_o\alpha$ антитілами. Для фосфорилювання використовувались як комерційні препарати ферменту (<Sigma<, активність 41 пмоль /мг фермента сек.), так і виділені нами за методом(14). Під час фосфорилювання і на протязі всього часу інкубації з радіоактивним лігандом в інкубаційному розчині був присутній селективний інгібітор протеінфосфатаз - окадеінова кислота, в кінцевій концентрації, що дорівнює 2 мкмоль/л (30). В контрольних експериментах АТФ було замінено на його аналог, що негідролізується, - АффNHф. Результат досліду представлено на мал. 7. З цих даних можна спостерігати, що обробка препарату мембран каталітичною субодиницею ПКА знищує здатність ГДФβS збільшувати зв'язування [7,8 ^{3}H] ДА з ДА рецепторами після обробки антитілами до анти-$G_o\alpha$

3.Зв'язування ГДФ-α-^{33}P з нейрональними мембранами.

Для дослідження мембранних G-білків що стимулюється медіатором в представленій роботі використовувався радіолігандній аналіз зв'язування гуанінових нуклеотидів G-білками (82, 91) (див. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ), який дозволяє оцінити обмежуючий швидкість етап у ферментативному циклі цих регуляторних білків : дисоціацію ГДФ від α-субодиниці G-білку. При застосуванні методу тонкошарової хроматографії інкубація мембран з ГТФ-α-^{33}P на протязі 30 хвилин давала можливість спостерігати 65 % загальної радіоактивності в досліджуваній пробі в місці локалізації ГДФ. Цей факт свідчить про те, що більша частина всієї мітки, як зв'язаної з мембраною, так і тієї, що знаходиться у вільному стані являє собою ГДФ. Починаючи з 20 хвилини інкубації мембран з ГТФ-α-^{33}P на протязі наступних 30 хвилин кількість мітки, що зв'залась, достовірно не змінювалась. Отримані результати вказують на те, що зв'язування ГДФ-α-^{33}P з мембранами після 20 хвилин інкубації є стабільним процесом. В цих умовах внесення в інкубаційне середовище ГТФγS приводило до зсуву рівноваги в стані G-білків, що виявлялось в зменшенні з часом кількості зв'язаної радіоактивної мітки (мал. 9). В присутності ДА та ГТФγS зв'язування ГДФ-α-^{33}P зменшувалось на 80 -90 % на протязі 8 хвилин.

Швидкість зменшення зв'язування можна представити у вигляді $K_{-1} = \frac{Ln\ (C/C_0)}{t}$ ($хв^{-1}$), де C - зв'язування в момент часу t>0, а C_0 - звс'язування ГДФ-α-^{33}P в момент t = 0 (91). В такій формі K_{-1} = 0,07 $хв^{-1}$ для ГТФγS та K_{-1} = 0,24 $хв^{-1}$ для ДА + ГТФγS. Інкубація мембран з радіоактивною міткою в присутності антагоністу $Д_2$ рецепторів - сульпіриду (100 мкмоль/л) - приводила до помітного (але не повного) інгібування зменшення зв'язування ГДФ -α-^{33}P при додаванні ДА та ГТФγS (мал. 9). Агоніст ДА- 6,7-АДТН діяв як і ДА 10. Вплив фосфорилювання на ГТФ ⟺ ГДФ обмін.

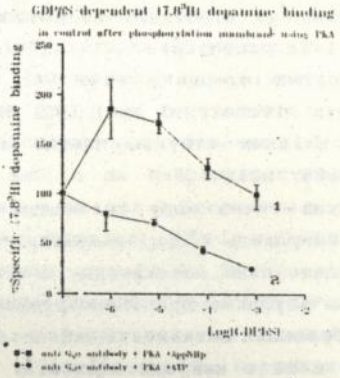
Фосфорилювання мембран під час їх преінкубації з кПКА викликало помітне зменшення базального рівня зв'язування радіоактивної мітки -на 45 %; змінювалось також і індуковане ГТФγS зменшення зв'язування ГДФ-α-^{33}P: K_{-1} = 0,05 $хв^{-1}$. На мал. 9, базальний рівень зв'язування ГДФ-α-^{33}P + кПКА зведений до рівня зв'язування в контролі, без кПКА. Під впливом ДА + ГТФγS на фосфорильовані мембрани K_{-1} витіснення ГДФ-α-^{33}P дорівнювало 0,16 $хв^{-1}$; для випадку з 6,7-АДТН K_{-1} = 0,07 $хв^{-1}$.

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані нами результати свідчать про те, що ДА впливає на активність АЦ в мембранах нервових клітин молюска *Lymnaea* як стимулюючим, так і інгібуючим чином. При цьому ступінь проявлення та направленість дії ДА залежить від концентрації ГТФ. В цьому відношенні, процес трансмембранної сигналізації, викликаний ДА, в нервовій тканині п'явушника схожий з цим же процесом в нервовій системі хребетних тварин, де рецепція ДА веде, в залежності від концентрації ГТФ в розчині до стимуляції або до інгібування АЦ (98). Виходячи з одержаних нами даних, можна провести подальші аналогії властивостей АЦ в мембранах нервових клітин *Lymnaea* із властивостями АЦ хребетних. Медіатори, що традиційно впливають на активність АЦ хребетних : АКТГ, простагландіни та енкефаліни (18, 85) впливають і на активність АЦ в нервовій тканині *Lymnaea*, як в напрямку стимулювання, так і інгібування. Направленість ефекту нейропередатчиків залежить від концентрації ГТФ та інгібується додаванням ГДФβS. Стимулюючий вплив на АЦ проявляє форсколін та його агоніст 7-О-хемісукциніл 7-діацетіл форсколін. Як показали результати наших електрофізіологічних експериментів, в КГР ДА індукує виникнення двох типів відповідей (де- та гіперполяризуючі), а також їх комбінації - двофазні іонні струми. Оскільки відомо, що ці

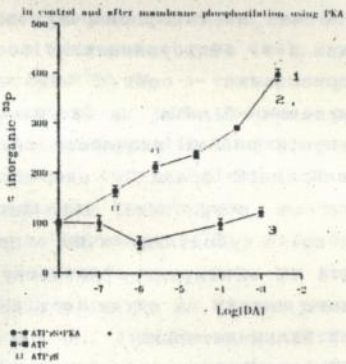
Мал. 7.

ГДФβS-залежне специфічне зв'язування з нейрональними мембранами [7,8^{3}H] дофаміна в концентрації 1.4 нмоль/л після їх обробки антитілами, одержаними проти консервативної амінокислотної послідовності $G_o\alpha$ субодиниці G-білків. Мембрани фосфорилювались каталітичною субодиницею цАМФ-залежної протеїнкінази (ПКА). 1. - ПКА + АМФфNHф; 2 - ПКА + АТФ.



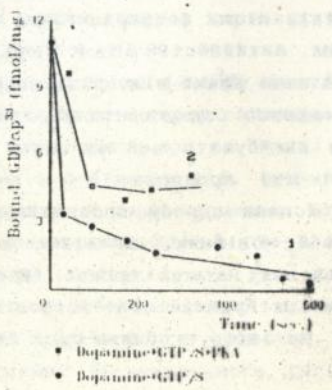
Мал. 8.

Вплив фосфорилювання мембран за допомогою каталітичної субодиниці протеїнкінази А (кПКА) на дофамін- залежну ГТФазну активність в нейрональних мембранах молюска. 1. - АффNHф; 2. - АТФγS; 3. - АТФγS + кПКА.



Мал. 9.

Зміни в часі кількості зв'язаного ГДФ-α-^{33}P в присутності кПКА (10 мкг фермента / 200 мкг мембранного білку) порівняно з контролем після додавання 5 мкмоль/л ГТФγS + 10 мкмоль/л ДА (1) и 5 мкмоль/л ГТФγS + 10 мкмоль/л ДА + кПКА (2).



нейроендокринні клітини не чутливі до серотоніну (99), то можна припустити, що відповіді обох типів реалізуються лише в результаті активації ДА рецепторів.

Аналізуючи одержані нами ВАХ ДА-індукованних струмів, а також враховуючи літературні дані (39, 88, 99), можна припустити, що іонна природа вхідних струмів швидше за все - натрієва, а вихідних - калієва (85, 99).

Наведена точка зору співпадає з тим, що $Д_2$ рецептори хребетних тварин стимулюють K^+-провідність та інгібують АЦ (10, 18, 88).

Проведене нами дослідження властивостей АЦ в мембранах з нервової тканини п'явушника продемонструвало існування ДА-залежної стимуляції та інгібування активності АЦ в цій тканині. Оскільки відомо, що ін'єкція цАМФ в нейрони молюсків, викликає головним чином появу Na^+ струму (1, 2, 83), то можна припустити, що і в нашому випадку деполяризуючий компонент ДА-струму зв'язаний з підвищенням активності АЦ, в той час як гіперполяризуючий компонент обумовлений процесами, спряженими з її інгібуванням.

Фосфорилювання - один з найбільш загальних механізмів регуляції функціонування білків, в тому числі і рецепторих (16, 19). В представленій роботі вивчались зміни в гормон-залежній активації ДА АЦ в мембранній фракції, одержаній з нейрональних тканин *Lymnaea stagnalis*, в результаті дії каталітичної субодиниці ПКА. Вплив каталітичної субодиниці ПКА приводив до зменшення базальної активності АЦ. Знижувався на цьому фоні і стимулюючий ефект ДА, але інгібуючого впливу на активність АЦ не спостерігалось. Цей феномен ми дослідили більш детально.

Активація АЦ за допомогою фториду алюмінію (пряма, без участі рецепторів), після фосфорилювання мембран кПКА приводила до значного збільшення активності АЦ в порівнянні з контролем. Можливо, що знайдений нами ефект відображає властивість фосфорильованих G_s-білків більш ефективно стимулювати АЦ, або ж вказує на зменшення здатності G_i-білків інгібувати цей фермент. Не можна ігнорувати і можливість сполучення цих процесів.

Ми здійснили спробу проаналізувати один з вірогідних механізмів регуляції $Д_2$-подібних відповідей в КГР, а саме, вплив цАМФ-залежного фосфорилювання на цей процес. Пролонгуючи дію ендогенного цАМФ за допомогою інгібування цАМФ-фосфодіестерази ІБМК, ми відкрили зворотн дію ІБМК, що інгібує обидва типи ДА-викликаного струму.

Рецепція дофаміну на клітинних мембранах, виділених з різноманітних тканин хребетних відбувається за участю як мінімум двох різних (в фармакологічному та генетичному розумінні) сімейств трансмембранних рецепторів ($Д_1$ та $Д_2$), як спряжених з різними ГТФ-зв'язуючими регуляторними гетеротримерними білками (G-білками) (18, 79). Рецепція біогенних амінів на нейрональних мембранах молюсків вивчалась найбільш детально за допомогою міченого неселективного антагоністу (dLSD) в тканинах *Aplysia californica* та *Helix pomatia*. При цьому виявилось, що рецепція ДА та серотоніну здійснюється різними рецепторами, але використання dLSD не дозволяє аналізувати ДА та 5-HT рецептори незалежно один від одного (76). Вивчення зв'язування міченого ДА з мембранами з нервових тканин *Planorbis corneus* продемонструвало існування двох типів ДА рецепторів (високо- та низькоафінні) (94), а в нервових центрах та сітківці *Octopus octopus* за допомогою селективного антагоністу $Д_1$ рецепторів - SCH 23390 - виявлено існування $Д_1$- подібних рецепторів (69).

Радіолігандний аналіз зв'язування [7.8^{3}H] ДА, а також агоністу $Д_1$ рецепторів [^{3}H] SKF 38393, представлений в цій роботі, дозволяє припустити, що в нервовій системі *Lymnaea stagnalis* існують рецептори ДА, які мають високу та низьку спорідненість до цього нейропередатчика. Щільність високоафінних рецепторів, виміряна за допомогою радіолігандного аналізу зв'язування [^{3}H] SKF 38393 з мембранами, співпадає з щільністю високоафінних місць зв'язування, одержаною при аналізі зв'язування міченого ДА . Ці результати, а також той факт, що ДА або стимулює, або інгібує активність АЦ в нейрональних мембранах молюска в залежності від концентрації ГТФ, дає можливість припустити, що трансдукція ДА сигналу в нервових тканинах молюсків подібна тій, яка описана у хребетних (98, 104).

Зміни афінності мембранних ДА-рецепторів до [7.8^{3}H] ДА та [^{3}H] - SKF 38393 у *Lymnaea stagnalis* демонструють явну залежність від присутності гуанінових нуклеотидів, що свідчить про те, що ці ліганди є агоністами ДА рецепторів, спряжених з G-білками (18, 33). Рецепція ДА викликала в мембранах з нервових тканин *Lymnaea stagnalis* підсилення ГТФ-азної активності та прискорення ГДФ ↔ ГТФ обміну, що безпосередньо свідчить про залучення G-білків до дії ДА (33). Отримані нами результати підтверджуються роботами інших дослідників. Так, участь G-білків (G_o-подібних) в дії ДА в нервовій системі молюсків прямо показано при дослідженні ДА-викликаного інгібування

потенціалзалежних Ca^{2+} каналів в нервових клітинах *Lymnaea stagnalis* (1, 39). Відсутність значних змін в ГДФβS-залежному зв'язуванні міченого ДА після обробки мембран антитілами до $G(\beta_1+\beta_2)$ хребетних тварин, недостатньо, щоб говорити про механізм взаємодії ДА рецепторів молюсків з різними субодиницями ГТФ-зв'язуючих білків.

Вплив гуанінових нуклеотидів в експериментальних умовах in vitro зводиться частіше за все до значного зменшення спорідненності рецепторів до агоністів (18). Нам вдалося виявити в літературі лише одне виключення з такого правила. Рецептори, які зв'язують $ПГЕ_2$ (простагландін E_2), виділені з нюхательних структур нервових тканин собак, збільшували спорідненість до ліганду в 2 - 3 рази в присутності гуанінових нуклеотидів. Вплив нуклеотидів реалізовувався через чутливі до коклюшного токсину G-білки (106).

Виходячи з представлених в цій роботі даних, можна припустити, що спільний механізм існує і в нервових тканинах молюска *Lymnaea stagnalis*. В наших даних про ГДФ- та ГДФβS-залежну регуляцію зв'язування агоністів ДА рецепторів можна відзначити декілька принципових моментів. Найбільш наявними з них варто вважати дані про гетерогенність популяції ДА рецепторів, афінність яких змінюється під впливом гуанінових нуклеотидів, в той час, як зв'язування [^{3}H] SKF 39393 в контрольних дослідах носить моновалентний характер. Внесення в інкубаційний розчин ГДФ та Mg^{2+} призводить до появи рецепторів з низько- та високоафінним типом зв'язування. При цьому високоафінні рецептори складають меншість. Ці спостереження можуть свідчити про неоднакову чутливість G-білків до різних концентрацій гуанінових нуклеотидів, як це показано у випадку з $G_s\alpha$, спорідненість у якого до ГТФ (ГДФ) набагато вище, ніж у $G_i\alpha$ (33). Зменшення стимулюючого впливу ГДФβS на зв'язування міченого ДА вказує на те, що цАМФ-залежне фосфорилювання може змінювати взаємодію ДА рецепторів з G-білками.

Ми показали, що фосфорилювання мембран, одержаних з нервової тканини *Lymnaea st.*, призводить до зменшення ДА-залежного інгібування активності АЦ, а також в багато разів збільшує AlF^{4-}-стимульовану активність цього ферменту.

Електрофізіологічні досліди також показали, що ДА-індукований калієвий струм в клітинах, що продукують гормон росту в ЦНС *L. stagnalis*, помітно зменшує свою амплітуду в присутності інгібітору фосфодіестераз.

Таким чином, в нервовій системі п'явушника стимуляція активності

АЦ ДА може приводити до розвитку десенситізації як $Д_1$, так і $Д_2$ рецепторів. Так як відомо, що інгібування АЦ та збільшення K^+-провідності відбувається за участю G_i-білків (18, 88), а серед субстратів для ПКА знайдені G_i- та G_o-білки (але не G_s (16, 38, 46, 107)), то найбільш вірогідним слід вважати залучення G_i-подібних білків до ГДФ-залежного збільшення афінності ДА рецепторів до їх агоністів в нервовій тканині п'явушника.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що прикладання ДА до мембран ідентифікованих нейроендокринних клітин *Lymnaea stagnalis* приводить до появи трансмембранних вхідних та вихідних струмів. Інгібітор фосфодіестераз викликає зменшення ДА-залежного вихідного струму. Зменшення ДА-викликаного вхідного струму спостерігається також при частій аплікації ДА або його агоніста. Припускається, що в ЦНС молюска виникає десенситізація відповідей на ДА, яку частково можна пояснити участю каскада цАМФ.

2. Описано зв'язування ДА в мембранах, яке проходить за участю не менш як двох типів рецепторів. Активація одного з них - $Д_1$-подібного - приводить до збільшення активності мембранної АЦ. Активація рецепторів $Д_2$ типу інгібує АЦ. Стимуляція або інгібування активності АЦ залежить від концентрації ДА і ГТФ: порівняно великі концентрації медіатора і ГТФ (100 мкмоль/л) приводять до інгібування АЦ, менші (1-100 мкмоль/л) - збільшують її активність.

Продемонстровано, що рецепція ДА мембранними рецепторами викликає прискорення ГТФ ⟷ ГДФ обміну і підсилює ГТФ-азну активність.

3. Вперше описано, що гуанінові нуклеотиди впливають на афінність ДА рецепторів до їх агоністів по різному. Частина рецепторів збільшує свою афінність до лігандів в присутності ГТФ, ГДФ і ГДФβS. Друга, більш багаточисельна популяція рецепторів, зменшує свою афінність під впливом гуанінових нуклеотидів. Зменшення і, особливо, збільшення афінності, напевно, залежить від присутності іонів Mg^{2+}.

Зміна ГДФ-залежної спорідненості ДА рецепторів до агоністів після обробки мембран антитілами, одержаними до субодиниць G-білків, імунологічно подібних до β_1, β_2 і $G_o\alpha$ субодиниць G-білків хребетних тварин, свідчить про залучення цих білків в регуляцію рецепції ДА.

З'ясовано, що ГДФβS-залежне стимулювання зв'язування агоніста не інгібується після обробки мембран антитілами до $G_o\alpha$, що вказує на «непричетність» до ГДФ-викликаного збільшення афінності рецепторів до

ДА цієї форми G-білків.

4. Фосфорилювання мембран каталітичною субодиницею цАМФ-залежної протеїнкінази повністю інгібує стимулюючий вплив гуанінових нуклеотидів на зв'язування агоністів з ДА рецепторами та помітно пригнічує ДА-залежну ГТФ-азну активність. Таке інгібування впливає на фосфорилювання і на швидкість ДА-викликаного ГТФ ↔ ГДФ обміну.

Вперше показано, що активність АЦ після фосфорилювання мембранних білків помітно змінюється, це видно по зменшенню базальної активності фермента та інгібуючого впливу ДА на активність АЦ. Гормон-незалежна активація АЦ AlF^{4-} багаторазово підсилюється при фосфорилюванні мембранних білків, що може свідчити про більшу піддатність G_i-подібних білків інгібуючому впливу фосфорилювання ніж стимулючі G-білки.

5. Припускається, що в нервовій тканині п'явушника дофамінова стимуляція активності АЦ може приводити до розвитку десенситизації як $Д_1$, так і $Д_2$ рецепторів. Покільки інгібування АЦ і збільшення калієвої провідності проходить за участю G_i-білків, і серед субстратів для ПКА є як G_i-, так і G_o-білки (не G_s), то найбільш ймовірно припустити включення G_i-подібних білків в ГДФ(ГТФ)-залежне збільшення афінності ДА рецепторів до їх агоністів цієї тканини.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМАТИКОЮ ДИССЕРТАЦІЇ.

1. Прудніков І.М., Осіпенко О.М., Кастрикіна Т.Ф., Цивкін В.Р. Вплив дофаміну на іонну провідність та активність аденілатциклази в центральній нервовій системі п'явушника. // Нейрофізіолгія, 1992, Т.24, N 4, с. 437-451.

2. Прудніков І.М., Цивкін В.Р., Кастрикіна Т.Ф. ГТФ-залежна рецепція дофаміну в тканинах центральної нервової системи великого п'явушника. // Нейрофізіолгія, 1992, Т.24, N 4, с. 451-461.

3. Прудніков І.М. // Зростання спорідненості до агоністів в дофамінових рецепторах нейронів п'явушника під впливом гуанінових нуклеотидів. // Нейрофізіолгія, 1993, Т.25, N 5, с. -.

Заказ 269 Тир. 70 экз. 1991 г. Укрспецмонтажпроект