

Г. А. БУЗНИКОВ, Н. Д. ЗВЕЗДИНА, Н. В. ПРОКАЗОВА,
член-корреспондент АН СССР Л. Д. БЕРГЕЛЬСОН,
член-корреспондент АН СССР Т. М. ТУРПАЕВ

ВЛИЯНИЕ ГАНГЛИОЗИДОВ НА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТОК К НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИМ ПРЕПАРАТАМ

Многие нейрофармакологические препараты при действии на ранних эмбрионов морских ежей останавливают первые клеточные деления (деления дробления) и подавляют синтеза макромолекул (¹⁻³). В основе этих эффектов, по-видимому, лежат нарушения функций внутриклеточных ацетилхолина и моноаминов. Во всяком случае известно, что а) у ранних эмбрионов, начиная с «одноклеточной» стадии развития, есть ацетилхолин и моноамины; б) эмбриотоксические эффекты нейрофармакологических препаратов ослабевают или полностью нейтрализуются при внесении в инкубационную среду ацетилхолина или моноаминов (^{1,4,5}).

Имеются прямые доказательства существования эндогенных факторов, определяющих реакцию эмбриональных клеток на нейрофармакологические препараты. В опытах на морских ежах было установлено, что чувствительность к самым разнообразным нейрофармакологическим препаратам резко снижается (вплоть до полного исчезновения) при незначительном повышении количества подопытных эмбрионов в 1 мл морской воды. Минимальная блокирующая концентрация таких эмбриотоксических веществ, как различные индолилалкиламины, фенилалкиламины, производные фенотиазина и т. п., токсичная для 100—300 эмбрионов в 1 мл, оказывается совершенно неэффективной для 1000—2000 эмбрионов в 1 мл. Это снижение чувствительности обусловлено тем, что эмбрионы выделяют в инкубационную среду активные вещества, именуемые в дальнейшем Ан-факторами. Они действуют на эмбрионов как антагонисты нейрофармакологических препаратов, не снижая в то же время чувствительности ко многим другим блокаторам развития (колхицину, пуромицину, динитрофенолу и др.) (⁶).

Ан-фактор выделяется эмбрионами морских ежей в ходе нормального развития; под влиянием токсических нейрофармакологических препаратов это выделение становится более интенсивным (⁶). Поэтому возможно, что Ан-фактор — нормальный участник регуляторных процессов раннего эмбриогенеза, регулятор функций донервных медиаторов (⁷). Интерес к Ан-фактору повышается и в связи с тем, что он отличается очень высокой биологической активностью. Предварительные расчеты показывают, что минимальная эффективная концентрация Ан-фактора не может превышать 0,05 мкг/мл, т. е. должна быть значительно ниже летальных концентраций нейрофармакологических препаратов, действие которых он нейтрализует (⁶). В настоящей работе приведены результаты первых попыток идентифицировать Ан-фактор. Еще до начала соответствующих опытов мы смогли исключить из числа претендентов на роль Ан-фактора аминокислоты и нуклеотиды. Эти вещества не выделяются ранними эмбрионами морских ежей в окружающую воду и проявляют свое защитное действие против эмбриотоксических нейрофармакологических препаратов лишь в очень высоких концентрациях (^{1,6}).

Количественные данные, а также опыты с влиянием изменения полного состава инкубационной среды (искусственной морской воды) на чувствительность эмбрионов к нейрофармакологическим препаратам позволи-

ли исключить возможную идентичность Ап-фактора с биогенными моно-аминами (7).

Для проверки роли эндогенных липидных фракций ранних эмбрионов морских ежей в снижении чувствительности последних к нейрофармакологическим препаратам были получены фракции из эмбрионов *Arbacia lixula*, *Strongylocentrotus intermedius* и *S. nudus*, находящихся на «одноклеточной» стадии или стадии средней бластулы. Для испытания активности липидных фракций использованы оплодотворенные яйцеклетки *S. intermedius* и *S. nudus*. Суммарные липиды выделяли экстрагированием гомогената эмбрионов смесями хлороформ — метанол (2:1 и 1:2, по объему); экстракт промывали водой. Водный слой служил для выделения ганглиозидов, а хлороформный — для выделения нейтральных липидов и фосфолипидов (8). Липиды фракционировали на колонках с силикагелем (9) или ДЕАЕ-целлюлозой (10) и идентифицировали с помощью тонкослойной хроматографии (тс.х) на силикагеле (11). Ганглиозиды выделяли из диализованного водно-метанольного слоя методом препаративной тс.х на силикагеле; пятна на хроматограммах обнаруживали с помощью резорцинового реагента (12, 13). Резорцин-положительные фракции объединяли для последующего испытания их суммарной активности.

Предпринята также попытка выделить Ап-фактор из морской воды, в которой инкубировали густую суспензию эмбрионов. Присутствие там этого фактора констатировали по исчезновению чувствительности пикубируемых эмбрионов к нейрофармакологическим препаратам. Инкубационную воду диализовали и лиофилизировали; полученный сухой остаток (200 мг на 100 мл воды) экстрагировали смесью хлороформ — метанол (2:1). Экстракт упаривали, анализировали методом тс.х и проверяли биологическую активность по способности защищать подопытных эмбрионов от токсического действия нейрофармакологических препаратов. В контрольных опытах проверяли влияние экстракта на чувствительность эмбрионов к пуромизину.

Было обнаружено, что выделенные из эмбрионов суммарные нейтральные липиды, а также фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилхолин даже в высоких концентрациях (до 100 мкг/мл) не снижают чувствительности ранних эмбрионов к исследованным нейрофармакологическим препаратам (1-бензил-2,5-диметилсеротонину (BAS), α -диметил-2-индолилэтиламину (НК-122) и трипальдегиду). Лизофосфатидилхолин ($3 - 4 \cdot 10^{-5}$ M) как из эмбрионов морских ежей, так и из других источников, оказывает сильное эмбриотоксическое действие и не снижает чувствительности эмбрионов к нейрофармакологическим препаратам. Эти данные исключают идентичность Ап-фактора всем перечисленным выше липидам.

Отрицательные результаты получены и в опытах с простагландиноподобной фракцией эмбрионов. Так как идентификация простагландинов и проверка простагландиноподобной физиологической активности в исследованной фракции нами не проводилась, эти отрицательные результаты не являются окончательными. Их проверка представляется желательной еще и потому, что, как обнаружено, простагландины E_1 , $F_{1\alpha}$ и $F_{2\alpha}$ способны ослаблять действие нейрофармакологических препаратов (BAS и трипальдегида).

В то же время суммарные ганглиозиды эмбрионов обнаружили четкое защитное действие против нейрофармакологических препаратов. К сожалению, мы не можем назвать точные действующие концентрации ганглиозидов (из-за неполного растворения испытуемых образцов в морской воде). Известно лишь, что эти концентрации по крайней мере на один-два порядка ниже эффективных концентраций соответствующих нейрофармакологических препаратов.

Так как среди исследованных ганглиозидов эмбрионов морского ежа находились фракции, по R_f близкие к гематозиду печени крысы (рис. 1),

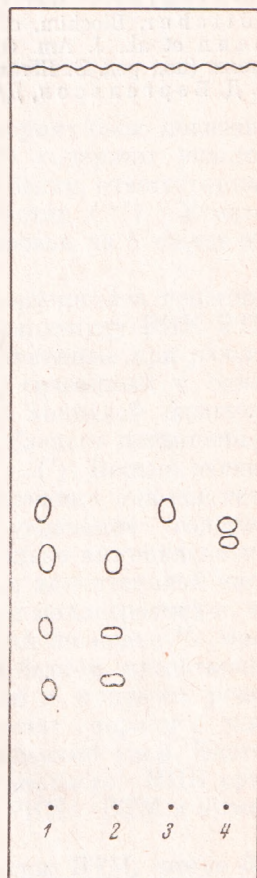
было испытано также и это вещество (¹³). Гематозид (0,3—1,0 мкг/мл) заметно ослаблял эмбриотоксическое действие нейрофармакологических препаратов (трипальдегида, НК-122, апрофена), взятых в более высоких (до 50 мкг/мл) концентрациях. Защитное действие суммарных ганглиозидов эмбрионов и гематозида печени крысы против нейрофармакологических препаратов приводило иногда к полной нормализации развития.

Эффективным против нейрофармакологических препаратов оказался и хлороформ-метанольный экстракт воды, содержащей АН-фактор. По данным т.с.х., в этом экстракте присутствуют резорцин-положительные сиалосодержащие вещества, сходные по R_f с одним из ганглиозидов эмбрионов (рис. 1).

В заключение отметим, что ни ганглиозиды эмбрионов морских ежей, ни гематозид печени крысы, ни хлороформ-метанольный экстракт морской воды после инкубации в ней густой суспензии эмбрионов, ни сама эта вода, содержащая АН-фактор, не снижают чувствительности эмбрионов морских ежей к блокаде белкового синтеза антибиотиком пурамицину.

Таким образом, в случае ганглиозидов мы имеем дело с веществами, присутствующими у ранних эмбрионов морских ежей, по-видимому выделяемыми ими в окружающую воду и избирательно снижающими чувствительность эмбрионов к токсическим нейрофармакологическим препаратам. Эффективные концентрации ганглиозидов близки к ожидаемым для АН-фактора и значительно ниже, чем у всех других исследованных в этом от-

Рис. 1. Тонкослойная хроматограмма ганглиозидов на силикагеле. 1 — суммарные ганглиозиды бластул *S. intermedius*; 2 — стандартные моно-, ди- и трисиалоганглиозиды печени крысы (перечислены в порядке уменьшения значений R_f); 3 — стандартный гематозид печени крысы; 4 — хлороформ-метанольный экстракт диализованной лиофилизированной морской воды, содержащий АН-фактор. Хлороформ — метанол — 2,5 *N* аммиак (60—35—8); обнаружитель — резорциновый реagent



ношении веществ. Поэтому возможно, что АН-фактор является ганглиозидом или содержит ганглиозид в качестве одного из компонентов. Проверка этой возможности представляет большой интерес как в связи с изучением внутриклеточных регуляторных функций ацетилхолина и моноаминов, так и в связи с изучением биологической активности ганглиозидов.

Выражаем глубокую благодарность В. Е. Васильевскому, В. В. Сове и их сотрудникам за помощь в проведении настоящей работы на Морской экспериментальной станции в бухте Троицы.

Авторы выражают глубокую благодарность Э. В. Дятловицкой, А. М. Новикову за помощь в выполнении работы, а также Н. Ф. Кучеровой, С. Н. Голикову и Ю. И. Смушкевичу за предоставление нейрофармакологических препаратов.

Институт биологии развития
Академии наук СССР
Институт химии природных соединений
им. М. М. Шемякина
Академии наук СССР
Москва

Поступило
20 II 1973

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Г. А. Бузников, Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития, «Наука», 1967.
- ² G. A. Buznikov, A. N. Kost et al., J. Embriol. and Exp. Morphol., 233, 549 (1970).
- ³ Г. А. Бузников, Онтогенез, 2, 1, 5 (1971).
- ⁴ Г. А. Бузников, ДАН, 152, № 5 (1970).
- ⁵ G. A. Buznikov, A. V. Sakharova et al., J. Embriol. and Exp. Morphol., 27, 2, 339 (1972).
- ⁶ Г. А. Бузников, Н. Д. Звездина, Л. Н. Маркова, Журн. эволюцион. биохим. физиол., 7, 3, 241 (1971).
- ⁷ Г. А. Бузников, Н. Д. Звездина и др., Тез. VI совещ. эвол. физиол., посв. 90-летию со дня рождения Л. А. Орбели, «Наука», 1969.
- ⁸ I. Folch, M. Lees, G. H. Sloane-Stanley, J. Biol. Chem., 226, 1, 497 (1957).
- ⁹ C. Pries, I. Anmount, J. F. Böttcher, Biochim. et biophys. acta, 125, 277 (1966).
- ¹⁰ G. Rousser, A. I. Baumann et al., J. Am. Oil Chem. Soc., 38, 544 (1965).
- ¹¹ Хроматография в тонких слоях (под ред. Э. Шталя), М., 1965.
- ¹² Э. В. Дятловицкая, А. М. Новиков, Л. Д. Бергельсон, ДАН, 197, 966 (1971).