



УДК 547.993.04

## ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АПАМИНА С СИНАПСОСОМАМИ

Елякова Е. Г., Луценко В. К., Подрезова Е. И.,  
Луценко Н. Г., Мирошников А. И.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шемякина  
Академии наук СССР, Москва

Методом дифференциальной флуоресцентной спектроскопии определены параметры связывания апамина (нейротоксин из яда пчелы) с синаптосомами. Показано, что апамин не влияет на высвобождение  $\gamma$ -аминомасляной кислоты синаптосомами и снижает на 70% высокоаффинный захват нейромедиатора. Эффект подавления захвата, зависящий от  $\text{Ca}^{2+}$ , характерен также для модифицированных аналогов апамина, проявляющих биологическую активность. Блокатор  $\text{K}^+$ -каналов, 4-аминопиридин, препятствует действию апамина.

Одним из наиболее интересных фармакологических агентов, действующих на синаптическую передачу, является апамин — октадекапептид из яда медоносной пчелы *Apis mellifera* [1]. В последнее время этот пептид интенсивно исследуется как в химическом, так и в биологическом плане: получен ряд модифицированных производных [2, 3], синтетических аналогов [4, 5], установлена пространственная структура в растворе [6], электрофизиологическими исследованиями показано, что апамин селективно блокирует  $\text{K}^+$ -каналы плазматических мембран [7, 8]. В то же время апамин оказывает мощное возбуждающее действие на центральную нервную систему [9]. Механизм этого эффекта неизвестен, хотя можно предполагать, что он является следствием либо вызванной апамином деполаризации нейронов, либо блокирования им тормозных синапсов. Поскольку апамин не вызывает существенных изменений в электрогенезе нейронов [10] и гладкомышечных клеток [11], представляется вероятным его действие на центральные тормозные синапсы. Хорошо известно, что нарушение синтеза, секреции или рецепции  $\gamma$ -аминомасляной кислоты (ГАМК) — главного тормозного медиатора центральной нервной системы — неизменно сопровождается возникновением судорог [12], что наблюдается и при отравлении животных апамином [1].

В настоящей работе исследовано влияние апамина на изолированные ГАМКергические нервные окончания (синаптосомы), обладающие потенциалзависимыми ионными каналами и в полной мере сохраняющие способность к синтезу, секреции и обратному захвату  $\gamma$ -аминомасляной кислоты.

Связывание нейротоксина с синаптосомами мы попытались оценить, используя метод флуоресцентной спектроскопии, с помощью которого недавно было изучено взаимодействие тетродотоксина, аконитина и нейротоксина яда скорпиона нейрональными мембранами [13].

Коротковолновое положение максимума (325 нм) в спектре эмиссии

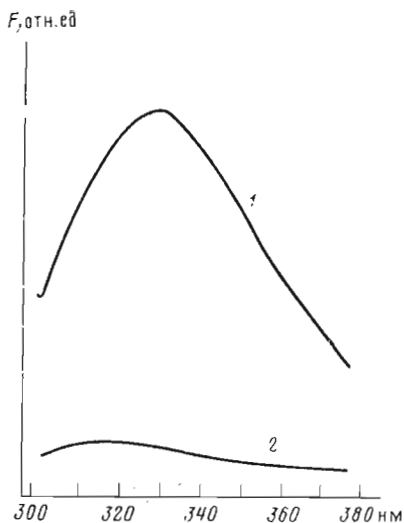


Рис. 1

Рис. 1. Спектры эмиссии, скорректированные по длинам волн, при  $\lambda_{\text{возб}}$  280 нм, 20° С: 1 — суспензия синапсом (20 мкг мембранного белка/мл) в буфере, рН 7,4 (160 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl); 2 — буферный раствор

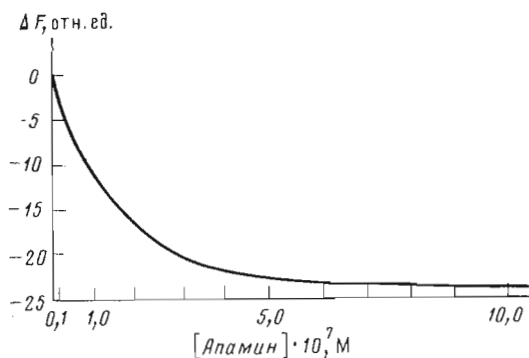


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость изменения флуоресценции суспензии синапсом (20 мкг мембранного белка/мл) под действием апамина при 20° С;  $\lambda_{\text{возб}}$  280 нм;  $\lambda_{\text{эм}}$  325 нм

( $\lambda_{\text{возб}}$  280 нм) препаратов синапсом (рис. 1) позволяет предположить наличие в белках синапсом остатков триптофана, находящихся в гидрофобном окружении [14].

Титрование синапсом апаминном, проведенное по методике [13], сопровождалось тушением флуоресценции. Синапсомы, выдержанные 30 мин при 80° С, имеют практически неизменный спектр флуоресценции, но титрование их апаминном уже не вызывает тушения флуоресценции. Поэтому при дифференциальном флуоресцентном титровании синапсом апаминном мы для компенсации светорассеяния препаратов синапсом и исключения эффектов, не связанных с взаимодействием апамина с биологическим рецептором, в качестве образца сравнения использовали инактивированные нагреванием синапсомы (рис. 2). Как видно из рис. 2, эффект гашения апаминном флуоресценции остатков триптофана белков синапсом имеет насыщающий характер, что может свидетельствовать в пользу специфической сорбции токсина синапсомами.

По методике, предложенной в работе [13], определена константа связывания  $K_d$  ( $5,09 \pm 1,99$ )  $\cdot 10^{-8}$  М и число участков связывания ( $7,5 \pm 4,1$ )  $\cdot 10^{-10}$  моль/мг мембранного белка. Близкие результаты для этих характеристик были получены ранее при изучении связывания радиоактивного производного апамина с синапсомами [15]. При титровании синапсом модифицированным аналогом апамина, [Ogn<sup>13</sup>(Pyr), Ogn<sup>14</sup>(Pyr)] апаминном, не проявляющим токсических свойств [3], гашение флуоресценции не наблюдалось.

На первом этапе изучения функционального действия апамина на синапсомы выявляли его влияние на основную функцию первого окончания — секрецию медиатора (в данном случае  $\gamma$ -аминомасляной кислоты), включающую в себя, как известно, вызванное деполяризацией мембраны поступление ионов кальция в нервное окончание, и сам процесс секреции медиатора. В физиологических условиях деполяризация мембраны первого окончания осуществляется нервным импульсом — потоком ионов натрия внутрь окончания. В настоящей работе для деполяризации мембраны использовано снижение электрохимического потенциала  $K^+$  — калиевая

Влияние апамина ( $2,5 \cdot 10^{-5}$  М), 4-аминопиридина и тетродотоксина на захват и высвобождение [ $^3\text{H}$ ]ГАМК синапсосомами в отсутствие двухвалентных катионов \*

Дополнительный компонент	Число опытов	Накопление [ $^3\text{H}$ ]ГАМК за 5 мин, (имп/мин)/мг белка	P	Число опытов	Высвобождение [ $^3\text{H}$ ]ГАМК, %	P
—	12	86 000±11 270		11	20,1±3,4	
Апамин	12	91 460±12 220		11	22,9±4,7	
4-Аминопиридин	12	52 580±6375	<0,02 (t)	12	10,4±8,5	>0,05 (t)
Апамин+4-аминопиридин	12	57 600±6900	<0,05 (t)	12	19,0±4,8	
Тетродотоксин	10	124 770±15 935	0,01 (T)	11	22,9±5,9	
Апамин+тетродотоксин	10	122 830±13 750	<0,05 (t)	11	19,6±6,6	

\* Состав среды — см. «Экспериментальная часть». Экспериментальные данные в этой и последующих таблицах представляют среднеарифметические ± стандартные ошибки для данного числа наблюдений. P — величина уровня значимости по критерию, указанному в скобках [16]. Концентрация [ $^3\text{H}$ ]ГАМК  $1,5 \cdot 10^{-7}$  М.

Таблица 2

Влияние апамина ( $2,5 \cdot 10^{-5}$  М) и 4-аминопиридина на захват и высвобождение [ $^3\text{H}$ ]ГАМК синапсосомами в отсутствие ионов калия

Дополнительный компонент	Число опытов	Накопление [ $^3\text{H}$ ]ГАМК за 5 мин, (имп/мин)/мг белка	P	Высвобождение [ $^3\text{H}$ ]ГАМК, %
—	8	68 140±16 290		12,6±4,7
Апамин	8	69 270±17 770		15,2±8,6
4-Аминопиридин	7	21 125±6645	0,01 (T)	
Апамин+4-аминопиридин	7	27 020±6705	0,01 (T)	

Примечание. Концентрация [ $^3\text{H}$ ]ГАМК  $1,5 \cdot 10^{-7}$  М.

деполяризация. Способ деполяризации не имеет значения для запуска механизма секреции, поскольку назначение деполяризации сводится к обеспечению поступления ионов  $\text{Ca}^{2+}$  через потенциалзависимые каналы, однако исключение  $\text{Na}^+$ -звена упрощает анализ действия агента.

Результаты изучения секреции  $\gamma$ -аминомасляной кислоты\* синапсосомами, инкубированными с апамином (табл. 1, 2), показывают, что независимо от состава среды, в которой проводилось накопление  $\gamma$ -аминомасляной кислоты, доля высвобожденного медиатора не отличалась от контроля. Поскольку в присутствии апамина деполяризация мембраны способствует высвобождению медиатора в той же степени, что и в контроле, можно сделать вывод, что механизм управления секрецией, т. е. поступление  $\text{Ca}^{2+}$  через потенциалзависимые каналы и собственно секреция ГАМК, не повреждается апамином. Точка приложения его действия, следовательно, должна быть другой.

Известно, что некоторые токсины обладают способностью блокировать высокоаффинную систему обратного захвата нейромедиатора из синаптической щели и тем самым препятствуют завершению его синаптического действия [17]. Поэтому следующим этапом работы было изучение действия апамина на эту систему. В предварительной серии экспериментов было установлено, что исследуемый нами процесс захвата  $\gamma$ -аминомасляной кислоты синапсосомами характеризуется высоким сродством к медиатору ( $K_m$  40 нМ), насыщением и ингибированием при снижении температуры до  $0^\circ\text{C}$ . Это позволяет отождествлять исследуемую нами систему высокоаффинного захвата с физиологической системой синаптической

\* Использован меченный тритием препарат [ $^3\text{H}$ ]ГАМК.

Влияние апамина на захват [<sup>3</sup>H]ГАМК синапсосомами в Ca<sup>2+</sup>-содержащей среде \*

Концентрация апамина, М	Время, мин	Число опытов	Захват [ <sup>3</sup> H] ГАМК синапсосомами, (имп/мин)/мг белка	Ингибирование захвата, %	P
0	10-15	13	29 335±1250		
10 <sup>-7</sup>	10-15	12	27 990±2075	5	
2,5·10 <sup>-5</sup>	10-15	12	21 995±2075	25	<0,01 (t)
0	60	4	13 355±1820		
10 <sup>-7</sup>	60	4	8585±1295	35,8	0,01 (T)
0	120	5	110 660±42 850		
2,5·10 <sup>-5</sup>	120	5	35 890±22 940	67,6	<0,01 (t)
0	120	5	116 250±13 750		
2,5·10 <sup>-5</sup> **	120	5	46 850±8660	59,8	<0,01 (t)

\* В первых пяти экспериментах концентрация [<sup>3</sup>H]ГАМК 1,5·10<sup>-8</sup> М, в остальных — 1,5·10<sup>-7</sup> М.

\*\* Апамин добавлен после завершения процесса захвата [<sup>3</sup>H]ГАМК синапсосомами (через 15 мин).

Таблица 4

Ca<sup>2+</sup>-Зависимость ингибирующего эффекта апамина (2,5·10<sup>-5</sup> М) на захват [<sup>3</sup>H]ГАМК синапсосомами

Апамин	Число опытов	Ca <sup>2+</sup>	Захват [ <sup>3</sup> H] ГАМК синапсосомами, (имп/мин)/мг белка	Ингибирование захвата, %	P
-	3	-	30 315±7640		
+	3	-	28 150±6020	5	
-	3	+	63 635±13 995		
+	3	+	17 440±1060	68,2	<0,05 (t)
-	3	+	5685±150		
+	3	+	1265±100	77,5	<0,001 (t)

Примечание. Время инкубации 105 мин; концентрация [<sup>3</sup>H]ГАМК 1,5·10<sup>-7</sup> М; в двух последних сериях экспериментов 1,5·10<sup>-8</sup> М.

инактивации нейромедиатора, обладающей аналогичными характеристиками [18].

Действие апамина в концентрации 10<sup>-7</sup> М выявляется только при длительных сроках инкубации (табл. 3). Через 60 мин при 37° С радиоактивность синапсосом в присутствии апамина составляла 65% по сравнению с контролем. В концентрации 2,5·10<sup>-5</sup> М апамина угнетал накопление [<sup>3</sup>H]ГАМК синапсосомами на 25% уже после 5-15 мин воздействия, а через 2 ч торможение достигало 70%. Эффект был выражен сильнее в случае использования низких концентраций γ-аминомасляной кислоты (1,5·10<sup>-8</sup> М по сравнению с 1,5·10<sup>-7</sup> М).

Угнетение апамином захвата γ-аминомасляной кислоты зависит от температуры. Синапсосомы, инкубированные с апамином при 0° С, накапливают такое же количество медиатора, что и контрольные, из чего следует, что ни связывание γ-аминомасляной кислоты, ни ее диффузия через мембрану синапсосом не затрагиваются нейротоксином и что апамин не обладает неспецифическим, например детергентным, действием. Поскольку некоторые синапсосомы сохраняют постсинаптический рецепторный участок, а существенных изменений в связывании медиатора при 0° С не выявлено, конкуренция апамина с хеморецептором представляется маловероятной (см. также [15]).

Анализ зависимости угнетения накопления [<sup>3</sup>H]ГАМК от концентрации апамина в обратных координатах Лайнуивера — Берка показал, что торможение имеет некооперентный характер. Это, возможно, означает, что

ослабление накопления медиатора вызвано усилением высвобождения его из нервных окончаний под влиянием апамина. Это предположение подтверждается следующими фактами. Если апамин добавлять в среду инкубации не одновременно с синапсомами, а через 15 мин, когда процесс накопления медиатора синапсомами достиг насыщения, то наблюдается высвобождение медиатора, причем количество оставшейся в терминалях [ $^3\text{H}$ ]ГАМК оказывается примерно таким же, как и в том случае, когда добавление апамина предшествовало периоду накопления медиатора синапсомами (табл. 3).

Вторым доказательством активного высвобождения  $\gamma$ -аминомасляной кислоты апамином является  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый характер действия апамина. В среде без двухвалентных катионов при 5-минутной инкубации (табл. 1) или в среде без  $\text{Ca}^{2+}$  при 105 мин инкубации (табл. 4) апамин даже в высокой концентрации не оказывал влияния на накопление медиатора синапсомами.

Недавно было высказано предположение, что мембранные эффекты апамина обусловлены блокированием  $\text{K}^+$ -каналов [7, 8]. Было показано, что агенты, усиливающие выход  $\text{K}^+$  из клеток печени (А-23187, АТР, норадреналин), утрачивают эту способность в присутствии апамина. Мы также исследовали эффекты указанных реагентов в тех же концентрациях на захват  $\gamma$ -аминомасляной кислоты синапсомами отдельно и в сочетании с апамином. Влияние норадреналина и АТР на захват медиатора синапсомами было слабым и неопределенным, а угнетение накопления медиатора в присутствии  $\text{Ca}^{2+}$ -ионофора (А-23187), напротив, слишком мощным. Апамин не влиял на эффекты норадреналина, АТР и А-23187. Таким образом, отождествление механизмов действия апамина на клетки печени и нервных окончания в настоящее время кажется преждевременным.

Представляло интерес сопоставить действие апамина и известных блокаторов ионных каналов на захват  $\gamma$ -аминомасляной кислоты изолированными нервными окончаниями. Для получения более четких результатов модификации ион-селективных каналов мы использовали два способа выключения катионного активного транспорта: инкубацию в среде без  $\text{Mg}^{2+}$  или в среде, лишенной  $\text{K}^+$ . 4-Аминопиридин, блокатор выходящего тока  $\text{K}^+$  [19], вызывал статистически достоверное подавление захвата медиатора в обеих средах, причем в среде без  $\text{K}^+$  действие 4-аминопиридина было выражено сильнее (табл. 1, 2). Это понятно, поскольку удаление  $\text{K}^+$  из среды инкубации, сопряженное с блокированием выхода ионов калия из синапсомом 4-аминопиридином, должно в большей степени снизить концентрацию ионов калия с наружной стороны мембраны, где находится  $\text{K}^+$ -центр  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТР-азы, и, следовательно, привести к более сильному уменьшению трансмембранного градиента ионов  $\text{Na}$ , энергия которого, по-видимому, и обеспечивает транспорт медиатора в нервные окончания. В отличие от апамина действие 4-аминопиридина на захват [ $^3\text{H}$ ]ГАМК проявлялось и в среде без  $\text{Ca}^{2+}$  (табл. 1). Не следует преувеличивать отмеченного различия, поскольку 4-аминопиридин использовали в значительно большей концентрации, чем апамин (соответственно  $1,2 \cdot 10^{-3}$  и  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М). Это обстоятельство может иметь решающее значение, поскольку известно, что усиление спонтанной секреции в адренергических нервах под влиянием 4-аминопиридина при низких концентрациях является  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимым, а при высоких эта зависимость утрачивается [19].

Интересные данные получены и в отношении специфического блокатора  $\text{Na}^+$ -каналов — тетродотоксина [20]. Оказалось, что в условиях ослабления активного катионного транспорта (см. выше) блокирование пассивной  $\text{Na}^+$ -проницаемости вызывает увеличение накопления [ $^3\text{H}$ ]ГАМК синапсомами. Этот факт можно рассматривать как еще одно доказательство существенной роли  $\text{Na}^+$ -градиента для транспорта  $\gamma$ -аминомасляной кислоты.

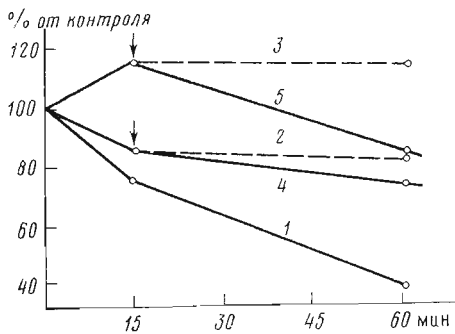


Рис. 3. Захват  $[^3\text{H}]$  ГАМК синапсосомами в  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащей среде в присутствии апамина (1), 4-аминопиридина (2), тетродотоксина (3), 4-аминопиридина с добавлением апамина (4), тетродотоксина с добавлением апамина (5). Момент добавления апамина ( $2,5 \cdot 10^{-5}$  М) указан стрелкой

При часовой инкубации синапсосом в  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащей среде апамин в концентрации  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М, как говорилось выше, тормозил захват медиатора на 60%, а для 4-аминопиридина эта величина равна 15%. В том случае, когда апамин и 4-аминопиридин добавляли в среду одновременно, угнетение захвата было меньшим, чем можно было ожидать в случае их аддитивного действия (рис. 3). Таким образом, обнаружен определенный антагонизм апамина и 4-аминопиридина, что согласуется с данными работ [7, 8] о действии апамина на  $\text{K}^+$ -каналы. Анализ кинетики подавления захвата медиатора апамином в присутствии тетродотоксина показывает, что эти два токсина действуют независимо друг от друга (рис. 3). Максимальное воздействие 4-аминопиридина и тетродотоксина на захват  $\gamma$ -аминомасляной кислоты синапсосомами достигается в отличие от апамина уже через 5–15 мин.

Необходимо было проверить, существует ли корреляция между действием апамина на тормозные нервные окончания и его токсичностью для животных. В табл. 5 приведены данные по влиянию на захват  $\gamma$ -аминомасляной кислоты синапсосомами апамина и его производных, различающихся по биологической активности. Полученные результаты свидетельствуют, что аналог, модифицированный по двум остаткам аргинина (полностью нетоксичный), и значительно менее, чем апамин, токсичный аналог (модифицированный по свободным аминогруппам и остатку гистидина) почти не оказывают влияния и на захват медиатора синапсосомами. Биологически активные производные (модифицированные по свободным аминогруппам) эффективны и в отношении захвата медиатора синапсосомами [3].

Результаты нашего исследования позволяют предположить, что причина возбуждения центральной нервной системы апамином — подавление функции тормозных нервных окончаний вследствие потери ими медиатора. Действительно, как показано выше, потери  $\gamma$ -аминомасляной кислоты синапсосомами под влиянием апамина достигали 70%. По-видимому, аналогичный механизм — уменьшение в терминали запаса медиатора, доступного для высвобождения, — лежит в основе подавления синаптической функции *n*-холинергического синапса Д-нейрона моллюска [21].

### Экспериментальная часть

Апамин выделяли из пчелиного яда по методу [22], производные апамина получали как описано ранее [2, 3].

Синапсосомы выделяли из головного мозга крыс согласно методикам [23, 24] и суспендировали в 10 мМ трис-НСl-буфере, содержащем 160 мМ NaCl и 10 мМ KCl. Концентрацию мембранного белка синапсосом определяли по Лоури [25]. При дифференциальном титровании в термостатируемые кюветы образца и сравнения помещали по 2 мл соответственно нативных и термически инактивированных синапсосом (7–40 мкг мем-

Влияние апамина и его модифицированных аналогов ( $10^{-7}$  М) на захват [ $^3$ H]ГАМК синапсомами \*

Дополнительный компонент	$LD_{50}$ (мол.) / $LD_{50}$ (нат.) [3]	Число опытов	Захват [ $^3$ H]ГАМК синапсомами, (имп/мин)/мг белка	Ингибирование захвата, %	P
—		5	6850±475		
Апамин		3	4830±215	29,5	0,01 (T)
[Ac-Cys <sup>4</sup> , Lys <sup>4</sup> (Ac)]апамин	2,0	5	4530±295	33,9	0,01 (U)
[Suc-Cys <sup>4</sup> , Lys <sup>4</sup> (Suc)]апамин	3,0	4	5455±315	21,4	>0,05 (T, U) **
[Orn <sup>13</sup> (Pyr), Orn <sup>14</sup> (Pyr)]апамин	>20	5	6330±415	7,6	
[Ac-Cys <sup>4</sup> , Lys <sup>4</sup> (Ac), His <sup>18</sup> (EtOCO)]апамин	5,0	5	6535±2720	4,6	

\* Suc — сукцинил, Pyr — пиримидил. Концентрация [ $^3$ H]ГАМК  $1,5 \cdot 10^{-8}$  М, время инкубации 105 мин.

\*\* P > 0,05 из-за малой величины выборки.

бранного белка/мл). Поглощение суспензии в диапазоне длин волн возбуждения не превышало 0,05 ОЕ. С помощью шприцев емкостью 10 мкл (Hamilton, Швейцария) в кюветы образца и сравнения добавляли равные объемы раствора апамина ( $6,75 \cdot 10^{-5}$  М). Измерение проводили на спектрофотометре «Aminco SPF-1000 CS» (США) при  $\lambda_{возб}$  280 нм,  $\lambda_{эм}$  325 нм, щели монохроматоров возбуждения и эмиссии 5 нм.

Стандартная среда инкубации содержала (мМ): NaCl — 155, KCl — 5, CaCl<sub>2</sub> — 2, MgCl<sub>2</sub> — 1,3, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 1,2, глюкозу — 10 (все реактивы марки ос.ч., «Союзреактив»), трис-HCl — 20 (Calbiochem, США); pH 7,6 (25°С). В ряде экспериментов из среды удаляли K<sup>+</sup> либо Ca<sup>2+</sup> (+1 мМ EGTA, Sigma, США) либо оба двухвалентных катиона (+2 мМ EDTA, Reanal, Венгрия). При исследовании Ca<sup>2+</sup>-зависимого высвобождения [ $^3$ H]ГАМК содержание K<sup>+</sup> было увеличено до 56 мМ с эквимолярным уменьшением ионов натрия.

В пробы, содержащие по 1 мл среды инкубации, добавляли \* [ $^3$ H]ГАМК (New England Boston, Mass, 34,7 Ки/ммоль)  $1,5 \cdot 10^{-7}$  или  $1,5 \cdot 10^{-8}$  М и в разных опытах апамин  $2,5 \cdot 10^{-5}$  или  $10^{-7}$  М; производные апамина  $10^{-7}$  М; тетродотоксин (Boeringer, Mannheim, ФРГ)  $10^{-6}$  М; 4-аминопиридин (Reanal, Венгрия)  $1,4 \cdot 10^{-3}$  М; битартрат норадrenalина (ч., «Союзреактив»)  $5 \cdot 10^{-6}$  и  $2,5 \cdot 10^{-5}$  М; АТФ (Serva, ФРГ)  $10^{-6}$  и  $10^{-5}$  М; Ca<sup>2+</sup>-ионофор А-23187 (Eli Lilly Co, США)  $5 \cdot 10^{-7}$  М. Контрольные пробы содержали только [ $^3$ H]ГАМК. После 5-минутного термостатирования при 37°С во все пробы добавляли синапсомы (0,2 мг мембранного белка/мл) и инкубировали 5–120 мин при 37°С. При длительных сроках инкубации метаболическое разрушение ГАМК предотвращали добавлением аминоксиуксусной кислоты (Sigma, США) до концентрации  $10^{-6}$  М. После окончания инкубации пробы фильтровали через мембранные фильтры BA 85 (Schleicher und Schüll, ФРГ), предварительно замоченные в среде инкубации. При изучении захвата медиатора синапсомы промывали на фильтрах средой инкубации 3 раза по 5 мл и 4-й раз — 10 мл. Для изучения высвобождения [ $^3$ H]ГАМК последнюю отмывку проводили средой с увеличенным содержанием калия. Фильтры с синапсомами подсушивали и помещали во флаконы с толуольным сцинтиллятором, содержащим 10% 2-метоксиэтанола (Pierce, США). Радиоактивность измеряли на сцинтилляционном спектрометре SL-30 (Intertechnique, Франция).

\* Указаны конечные концентрации в инкубационной среде.

Для выявления достоверности различия между сериями использовали критерий Стьюдента ( $t$ ), парный критерий Вилкоксона ( $T$ ) и критерий Вилкоксона — Манна — Уитни ( $U$ ) [16].

#### ЛИТЕРАТУРА

1. *Habermann E.* Bee and wasp venoms. The biochemistry and pharmacology of their peptides and enzymes are reviewed.— *Science*, 1972, v. 177, № 4046, p. 314–322.
2. *Vincent J. P., Schweitz H., Lazdunski M.* Structure-function relationships and site of action of apamin, a neurotoxic polypeptide of bee venom with an action on the central nervous system.— *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 11, p. 2521–2525.
3. *Мирошников А. И., Елякова Е. Г., Куделин А. Б., Сенявина Л. Б.* Исследование физико-химических характеристик нейротоксина из яда медоносной пчелы *Apis mellifica*.— *Биоорганическая химия*, 1978, т. 4, № 8, с. 1022–1028.
4. *Sandberg B. E. B.* Solid phase synthesis of 13-lysine-apamin, 14-lysine-apamin and the corresponding guanidinated derivatives.— *Int. J. Peptide Protein Res.*, 1979, v. 13, № 3, p. 327–333.
5. *Cosand W. L., Merrifield R. B.* Concept of internal structural controls for evaluation of inactive synthetic peptide analogs: synthesis of [Orn<sup>13,14</sup>]apamin and its guanidilation to an apamin derivative with full neurotoxic activity.— *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1977, v. 74, № 7, p. 2771–2775.
6. *Bystrov V. F., Okhanov V. V., Miroshnikov A. I., Ovchinnikov Yu. A.* Solution spatial structure of apamin as derived from NMR study.— *FEBS Lett.*, 1980, v. 119, № 1, p. 113–117.
7. *Banks B. E. C., Brown C., Burgess G. M., Burnstock G., Claret M., Cocks T. M., Jenkinson D. H.* Apamin blocks certain neurotransmitter-induced increases in potassium permeability.— *Nature*, 1979, v. 282, № 5737, p. 415–417.
8. *Maas A. J. J., Hertog A., Ras R., Akker J.* The action of apamin on guinea-pig taenia caeci.— *Eur. J. Pharmacol.*, 1980, v. 67, № 3, p. 267–274.
9. *Habermann E., Fischer K.* Apamin, a centrally acting neurotoxic peptide: binding and actions.— In: *Handbook advances in cytopharmacology*. N. Y.: Raven Press, 1979, v. 3, p. 387–393.
10. *Байдан Л. В., Владимирова Н. А., Мирошников А. И., Таран Г. А.* Действие апамина на синаптическую передачу в различных типах синапсов.— *Докл. АН СССР*, 1978, т. 241, № 5, с. 1224–1227.
11. *Maas A. J. J., Hertog A.* The effect of apamin on the smooth muscle cells of the guinea-pig taenia coli.— *Eur. J. Pharmacol.*, 1979, v. 58, № 2, p. 151–156.
12. *Tapia R.* Biochemical pharmacology of GABA in CNS.— In: *Handbook of psychopharmacology*. N. Y.: Plenum Press, 1975, p. 1–58.
13. *Гришин Е. В., Ефремов Е. С., Солдатов Н. М., Подрезова Е. И., Петренко А. Г.* Исследование взаимодействия нейротоксинов с возбудимой мембраной методом дифференциальной флуоресцентной спектроскопии.— *Биоорганическая химия*, 1980, т. 6, № 4, с. 576–584.
14. *Бурштейн Э. А.* Собственная люминесценция белка.— В сб.: *Итоги науки и техники. Сер. Биофизика*. М.: ВИНТИ, 1977, т. 7.
15. *Cavey D., Vincent J. P., Lazdunski M.* A search for the apamin receptor in the central nervous system.— *Toxicon*, 1979, v. 17, № 2, p. 176–179.
16. *Гублер Е. В.* Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: Медицина, 1978.
17. *Fohlman J., Eaker D., Dowdall M. J., Züllmann-Rauch R., Sjödin T., Leander S.* Chemical modification of taipoxin and the consequences for phospholipase activity, pathophysiology, and inhibition of high-affinity choline uptake.— *Eur. J. Biochem.*, 1979, v. 94, № 2, p. 531–540.
18. *Iversen L. L.* Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic transmission.— *Brit. J. Pharmacol.*, 1971, v. 41, № 4, p. 571–591.
19. *Kirpekar M., Kirpekar S. M., Prat J. C.* Effect of 4-aminopyridin on release of noradrenaline from the perfused cat spleen by nerve stimulation.— *J. Physiol.*, 1977, v. 272, № 3, p. 515–528.
20. *Blankenship J. E.* Tetrodotoxin: from poison to powerful tool.— *Prespect. Biol. and Med.*, 1976, v. 19, № 4, p. 509–526.
21. *Владимирова Н. А., Шуба М. Ф.* Влияние стрихнина, гидрастила и апамина на синаптическую передачу в гладкомышечных клетках.— *Нейрофизиология*, 1978, т. 10, № 3, с. 295–299.
22. *Gauldie J., Hanson J. M., Rumjanek F. D., Shipolini R. A., Vernon C. A.* The peptide components of bee venom.— *Eur. J. Biochem.*, 1976, v. 61, № 2, p. 369–376.
23. *Abita J.-P., Chicheportiche R., Schweitz H., Lazdunski M.* Effect of neurotoxins (veratridine, sea anemone toxin, tetrodotoxin) on transmitter accumulation and release by nerve terminals in vitro.— *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 9, p. 1838–1844.
24. *Hajos F.* An improved method for the preparation of synaptosomal fractions in high purity.— *Brain Research*, 1975, v. 93, № 3, p. 485–489.



25. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent.— *J. Biol. Chem.*, 1951, v. 193, № 1, p. 265–275.

Поступила в редакцию  
20.V.1981

#### APAMIN INTERACTION WITH SYNAPTOSOMES

ELYAKOVA E. G., LUTSENKO V. K., PODREZOVA E. I.,  
LUTSENKO N. G., MIROSHNIKOV A. I.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,  
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The parameters of apamin, a neurotoxin from bee venom, binding with synaptosomes were estimated by difference fluorescence spectroscopy. Apamin does not influence the release of  $\gamma$ -aminobutyric acid by synaptosomes, however it decreases a high-affinity neurotransmitter uptake by 70%. The effect is  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and is observed only with those apamin derivatives which exhibit biological activity. 4-Aminopyridine, a blocker of potassium channels, prevents the action of apamin.

---