

ВЛИЯНИЕ МОРФИНА НА ПОСТТРАНСЛЯЦИОННОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ ОБЩИХ ЯДЕРНЫХ БЕЛКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ОНТОГЕНЕЗА.

ВЕЛИЧКОВА А. А., ТЕНЧЕВА Ц. С.

Институт по изучению мозга, Болгарская Академия Наук, София

Однократное введение морфина в дозе 5 мг/кг крысам на ранних стадиях постнатального развития вызывало увеличение фосфорилирования общих ядерных белков коры больших полушарий головного мозга. Включение меченого фосфата у одноподневных крыс увеличилось на 35%, а к 11-му дню — лишь на 16—17%. У взрослых же животных введение морфина приводило к снижению фосфорилирования белков в гиппокампе на 12%, а в коре больших полушарий — на 26%. Обсуждается вопрос о возможных путях действия морфина на фосфорилирование общих ядерных белков головного мозга.

Обратимость фосфорилирования белков является важным механизмом контроля внутриклеточного метаболизма у всех эукариотов. Уровень фосфорилирования является показателем состояния активности протеинкиназ и протеинфосфатаз, обеспечивающих процессы фосфорилирования и дефосфорилирования. Ядерные протеинкиназы включают ферменты, переносящие γ -фосфат АТР на сериновые, треониновые, тирозиновые или гистидиновые аминокислотные остатки белков. Эти протеинкиназы еще мало изучены, хотя есть уже множество данных об их значимости в регуляции ядерных процессов и специально хромосомной конденсации, митоза и контроля транскрипции [1—3].

Известны литературные данные об изменениях уровня фосфорилирования ядерных белков головного мозга, вызванных сдвигами функционального состояния ЦНС или действием биологически активных веществ, таких как спермин, адреналин, энкефалины и их производные, а также, в частности, морфин [4—7]. Изменения под влиянием этих веществ зависят от конкретного периода развития организма, когда имеет место такое воздействие.

Несмотря на широкое исследование влияния морфина на организм, продолжает вызывать интерес, в частности, изучение механизма его биохимического действия при однократном и хроническом введении. При однократном введении, как показывают исследования последних лет, морфин проявляет свое действие через G-белки, ко-

торые представляют собой мембраносвязанные группы белков с выраженным сродством к GTP [8]. Литературные данные свидетельствуют о том, что морфин влияет на аденилатциклазу (АЦ), вызывая, в зависимости от продолжительности его воздействия, активирование или ингибирование фермента [9, 10]. Установлено, что в системе *in vitro* морфин не действует на посттрансляционное фосфорилирование белков [4]. В литературе отсутствуют данные о влиянии морфина на фосфорилирование ядерных белков на ранних этапах развития, тогда как в этот период уровень посттрансляционной модификации белков, так же как и влияние биологически активных веществ, являются максимально высокими.

Цель настоящей работы—исследование влияния морфина на фосфорилирование общих ядерных белков, выделенных из головного мозга крыс в постнатальном периоде развития, и определение значения зависимости степени происходящих изменений от продолжительности воздействия морфина.

Материалы и методы

Опыты были проведены на крысах-самцах линии *Wistar*. Животным подкожно вводили морфин из расчета 5 мг/кг однократно, а в отдельной серии—4 раза в той же дозе с интервалом в 12 ч.

Одну из групп подопытных животных составляли крысы 1-, 4- и 11-го дня после рождения, которым вводили морфин однократно. В другой группе были взрослые животные (3-месячные), которым вводили морфин однократно и повторно (4 раза). Через 2 ч после введения морфина животных декапитировали, извлекали головной мозг, у животных 1-й группы выделяли лишь кору больших полушарий (КБП), а у животных 2-й группы—КБП и гиппокамп. Ткань гомогенизировали в смеси, содержащей 1,8 М сахарозу, 10 мМ $MgCl_2$, 10 мМ трис- HCl , pH 7,4, центрифугировали в SW-роторе RPS-25-2 на ультрацентрифуге «Hitachi» при 91000 g 60 мин. Ядерную суспензию (50 мкг ДНК) инкубировали 5 мин в реакционной смеси, содержащей 0,32 М сахарозу, 1 мМ $MgCl_2$, 50 мМ KCl , 50 мМ $NaCl$, 5 мМ $Na_2P_2O_7$, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 50 мМ трис- HCl (pH 7,4), 3 мкКи $\gamma^{32}P$ -АТФ («Amersham», Англия). Фосфорилирование общих ядерных белков определяли способом пипетирования 20 мкл инкубационной смеси на фильтрах Whatman GF/A. Белки фиксировали в 10%-ной ТХУ, содержащей 0,5 М $Na_2P_2O_7$ и высушивали этанолом и эфиром. Радиоактивность определяли в сцинтилляционном растворе, содержащем 4 г PPO, 0,4 г POPOP в 1 л толуола на счетчике «Beckman 3801» (Австрия).

Количество белка определяли методом Lowry и соавт. [11].

Результаты и обсуждение

Морфин в использованной нами дозе 5 мг/кг, по литературным данным, не влияет на синтез белка в течение 3 ч после введения пре-

парата. В более высоких дозах (10 и 25 $\mu\text{г}/\text{кг}$) морфин первоначально ингибирует, а затем активирует включение меченых аминокислот в молекулы белка [12]. Нам обнаружено, что однократное введение морфина на ранних стадиях постнатального развития вызвало повышение уровня фосфорилирования общих ядерных белков КБП крыс (рис. 1). Повышение включения меченого фосфата оказалось наиболее выраженным у животных 1-го дня жизни на 35%, к 4- и 11-му дням постнатального развития уровень белкового фос-

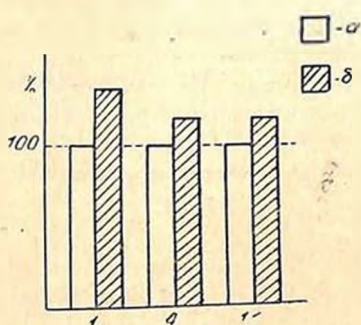


Рис. 1. Влияние морфина на фосфорилирование общих ядерных белков коры больших полушарий мозга крыс в процессе постнатального развития. Однократное введение морфина в дозе 5 $\text{мг}/\text{кг}$ крысам в возрасте 1,4 и 11 дней после рождения, $n=6$; здесь и на рис. 2, 3: а—контроль, б—морфин.

форилирования снижался, достигая прироста лишь на 16—17%. Эти результаты соответствуют полученным ранее данным о влиянии ряда биологически активных веществ на фосфорилирование белков, в которых было показано, что наиболее выраженный эффект обнаруживался именно в эмбриональный период развития и 1-й постнатальный день [7].

Для того, чтобы объяснить действие морфина на фосфорилирование белков, необходимо иметь в виду время появления и формирования опиоидных рецепторов. С помощью автордиографии они были выявлены и определены в ЦНС крыс на 14-й день эмбрионального развития. При этом число рецепторов для морфина оказалось достаточно низким, оно мало изменялось в первые дни постнатального развития, а затем быстро увеличивалось в период между 2- и 3-й неделями постнатального онтогенеза [13—16]. По данным Zhang и соавт. [17], у новорожденных животных при введении морфина имело место значительное снижение дыхания по сравнению с 14-дневными животными. Это дает основание предполагать, что влияние морфина в первые постнатальные дни жизни связано с изменением функциональной активности ЦНС, сопровождаемой активированием протеникиназ [17].

Основной путь действия морфина реализуется через активность АЦ, в результате чего изменяется концентрация сАМР в клетках [9, 10]. Наши исследования показали, что в первые дни после рождения уровень фосфорилирования общих ядерных белков не изменяется под влиянием сАМР, что свидетельствует о низком уровне активности фермента в этот период. Изученное нами фосфорилирова-

ние общих ядерных белков обусловлено главным образом действием сАМР-независимых, Ca^{2+} -кальмодулинзависимых протеникиназ и протеникиназы С. Полученные данные позволяют предполагать, что на ранних стадиях постнатального развития морфин вызывает активирование белкового фосфорилирования, что является компенсаторным механизмом при понижении интенсивности дыхания под влиянием морфина.

По литературным данным, морфин в такой же дозе использовали и другие авторы. При этом однократное введение его в этой же дозе вызывало ингибирование синтеза ДНК у животных на 4-й день после рождения, не действуя на более поздних сроках развития [18].

Авторы высказывают предположение, что морфин, вероятно, оказывает влияние на клеточную пролиферацию путем генерализован-

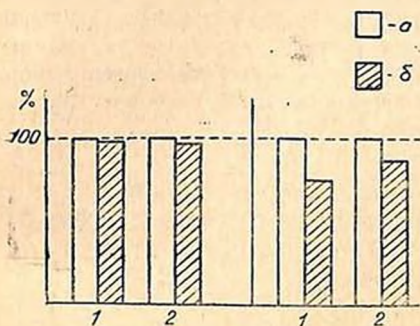


Рис. 2. Влияние морфина на фосфорилирование ядерных белков, выделенных из мозга взрослых крыс. 1—кора больших полушарий, 2—гиппокамп. Однократное введение морфина в дозе 5 мг/кг, $n=6$.

Рис. 3. Изменения фосфорилирования общих ядерных белков после 4-кратного введения морфина в дозе 5 мг/кг с интервалом 12 ч половозрелым животным. 1—кора больших полушарий, 2—гиппокамп, $n=6$.

ного метаболического воздействия. Установленное нами активирование фосфорилирования в ранние сроки постнатального развития свидетельствует именно о подобных метаболических изменениях.

При исследовании влияния морфина на фосфорилирование белков в КБП и гиппокампе взрослых животных было показано, что плотность морфиновых рецепторов в этих структурах НС высока [16]. В наших опытах однократное введение морфина в дозе 5 мг/кг не вызывало изменений фосфорилирования общих ядерных белков, выделенных из КБП и гиппокампа (рис. 2). Однократное введение морфина даже в более высоких дозах не вызывало изменений фосфорилирования белков микросомных фракций [20]. В синапсомной фракции этих же структур мозга не установлено изменения включения меченого фосфата [20]. Отсутствие изменений в посттрансляционной модификации общих ядерных белков, выделенных из КБП и гиппокампа, свидетельствует о высокой резистентности половозрелых животных к действию морфина. Учитывая гетерогенность нервной ткани, следует полагать, что полученные нами результаты суммируют специфические ответы разных типов ее клеток, так как возможна активация одних, торможение или отсутствие реакции у других. Изменение активности АЦ-системы одной клеточной популяции

может сглаживать реципрокные изменения или отсутствие таковых у других популяций.

Увеличение интенсивности включения меченых аминокислот связывают с продолжительностью действия морфина [12]. Нами установлено, что 4-кратное введение морфина приводило к снижению фосфорилирования белков в гиппокампе на 12% и в КБП на 26% (рис. 3). Наряду с этим Duman и соавт. [10] показали ингибирование АЦ-активности во фронтальной зоне КБП на 20—25%. Это дает основание предположить, что наблюдаемое нами понижение фосфорилирования белков являлось следствием пониженной активности cAMP-зависимой протеинкиназы.

Полученные результаты дают основание сделать заключение о наличии возрастной зависимости уровня фосфорилирования белков при воздействии морфина. Однократное введение морфина в ранний период постнатального развития увеличивало интенсивность включения меченого фосфата в белках, тогда как 4-кратное введение морфина половозрелым животным сопровождалось снижением включения меченого фосфата.

THE EFFECT OF MORPHINE TREATMENT ON POSTTRANSLATIONAL PHOSPHORYLATION OF THE RAT BRAIN TOTAL NUCLEAR PROTEINS DURING VARIOUS STAGES OF ONTOGENESIS

VELICHKOVA A., TENCHEVA Z.

Brain Research Institute, Bulgarian Academy of Science, Sofia

Single administration of morphine (5 mg/kg body weight) to rats in the early stages of postnatal development increased phosphorylation of total nuclear proteins of brain cortex. The incorporation of labelled phosphate increased by 35% after morphine application to newborn rats and by 16—17% on the 11th day after birth.

The effect of morphine on phosphorylation of total nuclear proteins isolated from brain cortex and hippocampus of mature animals was also studied. Single morphine treatment does not cause any change, whereas four successive morphine injections at 12-hour intervals resulted in a 12% reduction of nuclear protein phosphorylation in hippocampus and a 26% reduction in brain cortex.

The possible mechanisms of morphine action on total nuclear protein phosphorylation are discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Weller M. Protein phosphorylation, Academic Press, New York, 1979.
2. Cohen P. Recently discovered systems of enzyme regulation by reversible phosphorylation. Elsevier, North Holland-Amsterdam, 1980.

3. Rosen P. O., Krebs E. G. Cold Spring Harbor Conference on cell Proliferation, v. 8, 1981.
4. Oguri K., Lee N., Loh H. Biochem. Pharmacol., v. 25, p. 2371—2376, 1976.
5. Das R., Kanungo M. Indian J. Biochem. Biophys., v. 17, p. 217—221, 1980.
6. Витоцкий В. Н. Журн. общей биологии, т. 14, № 1, с. 183—193, 1983.
7. Величкова А., Тенчева Ц., Венков Л. Строеж и функции на мозъка, София, т. 15, с. 38—43, 1989.
8. Nestler E., Erdos J., Terwüger R., Daman S., Tallman J. Brain Res., v. 476, p. 230—239, 1989.
9. Cooper D., Gill D., Rodbell M. J. J. Neurochem., v. 38, p. 1164—1167, 1982.
10. Ruman S., Tallman J., Nestler E. J. Pharmacol. Exp. Ther., v. 246, p. 1033—1039, 1983.
11. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265—275, 1951.
12. Rönnebeck L., Hansson E. Biochem. Pharmacol., v. 35, p. 3685—3692, 1986.
13. Wohlmann M., Roth B., Coscia C. Dev. Brain Res., v. 3, p. 679—684, 1982.
14. Spain J., Roth B., Coscia C. J. Neurosci., v. 5, p. 584—588, 1985.
15. Ungerer J., Moliver M., Kukar M., Palacios M. Dev. Brain Res., v. 23, p. 306—307, 1985.
16. Kornblum H., Irlbut D., Leslie F. Develop. Brain Res., v. 37, p. 21—41, 1987.
17. Zhang A.-Z., Pasternak G. Eur. J. Pharmacol., v. 73, p. 29—40, 1981.
18. Kornblum H., Laughlin S., Leslie F. Develop. Brain Res., v. 31, p. 45—52, 1987.
19. Clark A., Jovic R., Ornellas M., Weller M. Biochem. Pharmacol., v. 21, p. 1939—1990, 1972.
20. Crowder J., Norris D., Bradford H. Biochem. Pharmacol., v. 35, p. 2501—2502, 1936.

Поступила 17. III. 1991