



УДК 591.81+591.481.1+612.015.48

АВТОРАДНОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СИНТЕЗА БЕЛКА В МОЗГУ КРЫС ПОД ВЛИЯНИЕМ ТЕТРАПЕПТИДА ТАФИНА И L-ДОФА

ХУДОЕРКОВ Р. М.

ИНИ мозга ВЦП психического здоровья АМН СССР, Москва

Авторадиографически изучали интенсивность включения DL-лейцина-2-[^3H] и белки функционально различных нейронов мозга крыс, получавших тетрапептид тафина L-Thr-L-Lys-L-Pro-L-Arg (300 мкг/кг) однократно (с длительностью воздействия 15 мин—модель повышенной эмоциональной активности со склонностью к агрессивности и повышению у животных способности находить выход из стрессовой ситуации), и крыс, получавших ежедневно в течение 3- и 4-х недель препарат Леводона (-)-3-(3,4-диоксифенил)-L-аланин (L-ДОФА) в дозе 100 мг/кг (модель эмоционального страха с нарушением условнооборонительных реакций). Исследовали нейроны слоев III, IV и V зрительной коры, нейроны слоев III и V сенсомоторной коры и нейроны хвостатого ядра. Обнаружили, что под влиянием тафина включение [^3H]лейцина в белки разных типов нейронов снижалось от 15 до 46%, за исключением ассоциативных нейронов слоя III сенсомоторной коры, у которых отклонение от контроля было не достоверно. Длительное введение животным больших доз L-ДОФА приводило к увеличению включения [^3H]лейцина. Через 3 недели включение метки в нейроны разных типов по сравнению с контролем повышалось от 19 до 79%, а через 4 недели—от 52 до 174%. Обсуждается вопрос о возможных путях действия испытуемых препаратов на обмен белков мозга.

Фармакологически направленное воздействие на животных, позволяющее воспроизводить психомоторное возбуждение, анксиогенные и аффективные состояния, широко используется для изучения механизмов биохимических процессов при моделировании нервно-психических расстройств [1, 2].

Тетрапептид тафин, наряду с присущими ему неспецифическими иммуностимулирующими свойствами [3], обнаруживает и регулирующее действие на поведение животных, то есть в зависимости от исходного эмоционального состояния он проявляет себя как стимулятор или транквилизатор [4]. В пределах 30 мин после введения он вызывает у интактных животных общее двигательное возбуждение, усиливает негативно-эмоциональные проявления и повышает у них способность находить выход из острой стрессовой ситуации [5, 3].

В отличие от тетрапептида тафина предшественник синтеза дофамина L-3,4-диоксифенилаланин (L-ДОФА)—препарат, применяемый при лечении паркинсонизма,—при однократном введении животным в дозе 100 мг/кг полностью блокирует у них видотипичную агрессию и повышает эксцентричные защитные реакции [2, 6], а при длительном его применении вызывает у животных сильный эмоцио-

пальный страх с нарушением условнооборонительного поведения [7].

Сопоставление сведений, имеющихся в литературе по вопросу о краткосрочном влиянии тафцина и длительном влиянии L-ДОФА на обмен веществ мозга, не позволяет провести столь четкого различия между действием этих препаратов, вследствие немногочисленных и порой противоречивых данных, как это наблюдается в физиологических исследованиях. На основании результатов биохимических [4, 5, 8, 9] и фармакоэтологических исследований [4, 10] можно сделать вывод, что тафцин активирует обмен катехоламинов, но при этом он, вероятно, не обладает дофаминстимулирующими свойствами.

Что касается длительного действия L-ДОФА на обмен веществ мозга, то на основании таких данных, как изменение чувствительности дофаминных рецепторов [11, 12] и дофаминзависимой аденилатциклазы [13], небольшого повышения активности тирозингидроксилазы [13], резкого увеличения активности MAO типа B наряду со снижением активности MAO типа A [14] и отсутствия изменений в содержании дофамина и гомованилиновой кислоты [13] можно сделать вывод только общего характера—что экзогенно вводимая L-ДОФА изменяет обмен катехоламинов в целом и, в частности, дофамин.

Принимая во внимание, что обмен катехоламинов тесно связан с обменом белков [15], мы поставили перед собой задачу изучить особенности краткосрочного влияния тафцина и длительного действия L-ДОФА на обмен веществ мозга посредством автордиографического изучения синтеза белка в разных типах нейронов мозга крыс.

Материалы и методы

Работа выполнена на крысах-самцах линии Wistar с массой тела 160 ± 10 г. На одной группе животных (5 особей) изучали кратковременное (15 мин) влияние тетрапептида тафцина L-Thr-L-Lys-L-Pro-L-Arg («Serva», ФРГ) в дозе 300 мкг/кг, а на другой группе животных (5 особей) изучали длительное (до 4-х недель) влияние препарата Леводопа (-)-3-(3,4-диоксифенил)-L-аланин (L-ДОФА) в дозе 100 мг/кг. Трем животным L-ДОФА давали ежедневно в течение 3-х недель, а двум—в течение 4-х недель с целью выяснения временной динамики его воздействия на синтез белка. Исследуемые препараты разводили на физиологическом растворе и вводили внутривентриально. Контрольные крысы получали только инъекции физиологического раствора. Экспериментальных животных (контрольных и подопытных) подвергали воздействию радионуклидом в течение 2 ч 30 мин. Радиоактивное соединение D,L-лейцин-2[^3H] (У. А. 8,8 мКи/ммоль, ЛМО «Изотоп») вводили внутривентриально из расчета 2 мКи/100 г. Причем 1 группе крыс изотоп давали за 2 ч 15 мин до введения тафцина, а II группе—сразу же после последнего введения L-ДОФА. Мозг животных фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафиновые блоки (контроль и опыт вместе) и раскладывали на срезы толщиной 5 мкм. При изготовлении радиоавтографов мозга [15] использовали ядерную фотоэмульсию типа «М» (Московский завод технических фотопластиков). Плотность зерен серебра в радиоавтографах определяли с помощью темы телевизионного анализа изображения Т. А. С.-Лейтс. С этой целью на мониторе световым пером обводили по контуру тело нейрона и измеряли его площадь. На фоне полученного изображения, используя его как маску, измеряли площадь зерен серебра, выявляемых в фотоэмульсионном слое над нейроном. Отношение полученных величин рассматривали как

оценку плотности радиоактивной метки в нейроне или величину интенсивности включения $[^3\text{H}]$ лейцина в белки данного нейрона. В сенсомоторной и зрительной областях коры исследовали нейроны проекционно-эфферентного типа (крупные пирамидные нейроны V слоя), ассоциативного типа (пирамидные нейроны III слоя и нейроны хвостатого ядра) и афферентные—зернистые нейроны IV слоя в зрительной коре. В каждой структуре мозга было изучено от 150 до 470 нейронов у контрольных и столько же у подопытных крыс. Достоверность различий средних значений исследуемых параметров оценивали с помощью t-критерия.

Результаты исследования

Через 15 мин после введения крысам тафцина интенсивность включения $[^3\text{H}]$ лейцина в белки нейронов исследуемых образований мозга (сенсомоторная и зрительная области коры больших полушарий и подкорковая структура—хвостатое ядро) снижалась на 15—46% по сравнению с контролем (табл. 1). Наиболее интенсивно реа-

Таблица 1

Влияние однократного (15 мин) воздействия тетраэпипеда тафцина (100 мг/кг) на интенсивность включения $[^3\text{H}]$ лейцина в белки нейронов сенсомоторной, зрительной коры и хвостатого ядра мозга крыс

Группы животных	Интенсивность включения $[^3\text{H}]$ лейцина $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Отклонение от контроля, %	Площадь нейрона, $\mu\text{м}^2$ $\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$	Отклонение от контроля, %
Контроль Опыт	Сенсомоторная кора, слой III 0.0102 ± 0.001 0.0097 ± 0.001	-5	172.00 ± 1.07 170.87 ± 1.12	-1
	Сенсомоторная кора, слой V 0.0158 ± 0.001 0.0086 ± 0.001		382.05 ± 4.61 377.35 ± 4.84	
Контроль Опыт	Хвостатое ядро 0.0147 ± 0.001 0.0086 ± 0.001	41***	126.65 ± 0.95 128.28 ± 0.89	+1
	Зрительная кора, слой III 0.0080 ± 0.001 0.0059 ± 0.001		144.39 ± 0.69 141.11 ± 0.65	
Контроль Опыт	Зрительная кора, слой IV 0.0117 ± 0.001 0.0093 ± 0.001	-15	89.99 ± 0.55 87.33 ± 0.59	-3
	Зрительная кора, слой V 0.0068 ± 0.001 0.0051 ± 0.001	-25**	252.51 ± 2.06 252.97 ± 2.57	0

Примечание. Здесь и в табл. 2 в каждой структуре мозга исследовано 150—470 нейронов у контрольных и столько же у подопытных крыс. Интенсивность включения $[^3\text{H}]$ лейцина в белки нейронов (величина, выражающая отношение площади, занимаемой зернами серебра над нейроном, к площади самого нейрона) представлена в усл. ед., * $p > 0.05$, ** $p > 0.01$, *** $p > 0.001$ по сравнению с контролем.

гировали крупные пирамидные нейроны V слоя сенсомоторной коры и нейроны хвостатого ядра—в них исследуемый показатель снижался на 41 и 46% соответственно. В то же время включение [^3H]лейцина в ассоциативные нейроны III слоя сенсомоторной коры оставалось практически на контрольном уровне. Реакция нейронов зрительной области коры по сравнению с сенсомоторной выглядела более однородной: и ассоциативные нейроны III слоя и проекционно-эфферентные нейроны V слоя включали метку почти одинаково—на 25—26% меньше, чем в контроле, а в афферентных нейронах IV слоя она была ниже контрольной величины на 15%.

В отличие от тафцина длительное введение больших доз L-ДОФА вызывало увеличение включения [^3H]лейцина в белки нейронов исследуемых образований мозга крыс (табл. 2). Через 3 недели

Таблица 2

Влияние длительного (3- и 4-недельного) воздействия L-ДОФА (100 мг/кг) на интенсивность включения [^3H]лейцина в белки нейронов сенсомоторной коры и хвостатого ядра мозга крыс

Группы животных	Интенсивность включения [^3H] лейцина $\bar{x} \pm Sx$	Отклонение от контроля, %	Площадь нейрона, $\mu\text{м}^2$ $\bar{x} \pm Sx$	Отклонение от контроля, %
Сенсомоторная кора, III слой				
Контроль	0.1202 $\pm$ 0.003		158.93 $\pm$ 1.21	
Опыт 3 недели	0.1430 $\pm$ 0.003	+19*	172.76 $\pm$ 1.28	+9
Опыт 4 недели	0.1825 $\pm$ 0.008	+52*	185.24 $\pm$ 1.56	+17
Сенсомоторная кора, V слой				
Контроль	0.1369 $\pm$ 0.004		320.55 $\pm$ 4.50	+9
Опыт 3 недели	0.2272 $\pm$ 0.003	+66**	393.37 $\pm$ 4.01	+3
Опыт 4 недели	0.3747 $\pm$ 0.01	+174***	361.87 $\pm$ 4.10	
Хвостатое ядро				
Контроль	0.0761 $\pm$ 0.003		114.38 $\pm$ 0.92	+3
Опыт 3 недели	0.1367 $\pm$ 0.004	+79**	110.64 $\pm$ 1.07	-3
Опыт 4 недели	0.1659 $\pm$ 0.009	+118**	115.37 $\pm$ 1.21	

включение метки возрастало на 19, 66 и 79% соответственно в нейронах слоев III и V сенсомоторной коры и нейронах хвостатого ядра, а через 4 недели после введения L-ДОФА включение [^3H]лейцина в указанных образованиях мозга увеличивалось по сравнению с контролем соответственно на 52, 174 и 118%. В этом эксперименте, так же как и при воздействии тафцином, ассоциативные нейроны III слоя сенсомоторной коры давали более слабую реакцию, чем проекционно-эфферентные нейроны V слоя этой же области коры.

Обсуждение результатов

Проведенная работа показала, что краткосрочное (15 мин) действие тетрапептида тафцина (модель повышенной эмоциональной активности, сопровождающейся усилением негативно-эмоциональных

проявлений и повышением у животных способности находить выход из стрессовой ситуации) характеризуется снижением включения [^3H] лейцина в белки нейронов, исследованных пяти образований мозга крысы. Причем это обнаруживается в разных типах нейронов (ассоциативных и проекционно-эфферентных) сенсомоторной, зрительной коры и нейронах подкорковых образований мозга—хвостатого ядра.

Как следует из данных литературы [17], под действием тафцина в нейронах сенсомоторной коры и нейронах хвостатого ядра изменяется содержание белка (интерферометрическое исследование) и меняются размеры клеток. Было обнаружено, что тафцин действует угнетающе на активность лейциламинопептидазы. Ее активность снижается на 30% во фракции клеточных митохондрий и на 50—80% во фракциях легких и тяжелых синантосом мозга кролика [18]. Влияние тафцина на синаптические мембраны прослеживается и при определении SH-группы во фракции тяжелых синантосом. До 30% повышается их содержание в низкомолекулярных тиолах и в замаскированных SH-группах белков [9]. Из литературы известно, что антипсихотические препараты (фенотиазинового и нефенотиазинового ряда) подавляют синтез белка, ДНК и особенно РНК [19—21]. Такое действие указанных препаратов объясняется тем, что они связывают специальные рецепторные места [20]. Исходя из того, что тафцину приписывают свойства антипсихотического препарата [3], можно предположить, что в основе снижения синтеза белка при действии тафцина также лежит связывание им специальных рецепторных мест.

Длительное введение крысам в больших дозах L-ДОФА (100 мг/кг), позволяющее создавать модель эмоционального страха с нарушением условнооборонительного поведения, приводит, как показала настоящая работа, к противоположному действию по сравнению с действием тафцина—к увеличению включения [^3H] лейцина во всех исследуемых типах нейронов сенсомоторной коры и нейронах хвостатого ядра. Причем интенсивность включения нарастала во времени—она была существенно выше через 4, чем через 3 недели.

Ряд данных свидетельствует о том, что длительное воздействие животных L-ДОФА может привести к изменению в обмене белков мозга. Так, небольшая доза L-ДОФА (25 мг/кг) при 2-недельном введении кроликам увеличивала активность лейциламинопептидазы во фракции нейронов и глии сенсомоторной коры на 150 и 130% соответственно, а в аналогичных фракциях хвостатого ядра—на 70 и 20% соответственно [22]. За этот же период в нейронах III слоя сенсомоторной коры, нейронах хвостатого ядра и N. accumbens мозга крысы аналогичная доза препарата увеличивала примерно в равной мере (от 24 до 48%) содержание как структурированных белков (интерферометрическое исследование) в нейронах, так и размеры клеток [23]. Это поддерживает мнение о том, что существует взаимосвязь между обменом дофамина, сульфгидрильно зависимыми ферментами и структурными белками [24]. Однако наряду с изменением обмена дофамина, который претерпевает изменения под влиянием длительного введения L-ДОФА [11—13] и может в свою очередь влиять на обмен белков, вероятно, и сама экзогенно вводимая L-ДОФА может оказывать влияние на обмен белков. Так, было показано, что L-ДОФА непосредственно связана с изменениями, возникающими в поведении животных, при введении им больших доз этого препарата [25]. Поэтому вопрос о прямом или опосредованном действии на синтез белка длительно вводимой L-ДОФА остается открытым.

Таким образом, проведенная работа показала, что испытуемые препараты—тетрапептид тафцин и L-ДОФА вызывают противоположные по своему действию изменения в синтезе белка в исследуемых типах нейронов. Тафцин через 15 мин после введения приводит к снижению включения [^3H] лейцина в белки нейронов, а длительно (до 4-х недель) вводимый препарат L-ДОФА повышает включение метки. Причем интенсивность включения [^3H] лейцина нарастает по мере удлинения действия препарата. Реакция разных типов нейронов неодинаковая. Наиболее интенсивно вне зависимости от испытуемого препарата реагируют проекционно-эфферентные нейроны V слоя и ассоциативные нейроны подкорковых образований мозга.

AUTORADIOGRAPHIC STUDY OF PROTEIN SYNTHESIS IN BRAIN OF RATS TREATED WITH TUFTSIN AND L-DOPA

KH. DOERKOV R. M.

Brain Research Institute, National Mental Health Center, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The present autoradiographic study was carried out to determine changes of ^3H -Leucine incorporation into proteins of brain neurons of rats treated with Tuftsin L-Thr-L-Lys-L-Pro-L-Arg (300 ug/kg) or L-3, 4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (100 mg/kg). The neurons of layers III and V of motor cortex, layers III, IV and V of visual cortex and neurons of n. caudatus were examined. The injection of Tuftsin to rats decreased [^3H]-Leucine incorporation in proteins of the studied neurones by 15—46% after 15 min. In contrast, the daily administration of L-DOPA to rats for 3 and 4 weeks led to increase in [^3H]-Leucine incorporation in neurons of various types. The label incorporation increased from 19 to 79% in 3 weeks and from 52 to 174% in 4 weeks as compared with the control level. Tuftsin and L-DOPA induced more prominent changes in the same types of neurons (large pyramid cells of layer V and neurons of n. caudatus). The action of Tuftsin and L-DOPA on protein metabolism in brain is discussed.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин Н. П. — В сб.: Фармакология нейропептидов, с. 102—111, М., 1982.
2. Вальдман А. В., Пошивалов В. П. Фармакологическая регуляция интуитивного поведения. Л., Медицина, 1984.
3. Вальдман А. В., Бондаренко Н. А., Козловская М. М., Русаков Д. Ю., Калихевич В. Н., Ардемасова З. А. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 93, № 4, с. 49—52, 1982.
4. Козловская М. М., Клуша В. Е., Бондаренко Н. А. — В сб.: Нейрохимические основы психотропного эффекта, с. 95—105, М., 1982.
5. Вальдман А. В., Козловская М. М., Ашмарин Н. П., Минеева М. Ф., Анохин К. В. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 92, № 7, с. 31—33, 1981.
6. Kantak K. M., Mezeck K. A. Psychopharmacol., v. 96, p. 468—476, 1988.
7. Айвазовили Н. М., Норданшвили Г. С., Николашвили М. Н. Нейрохимия, т. 4, № 2, с. 141—147, 1985.

8. Абдулов Н. А., Рожанец В. В. — В сб.: Фармакология нейропептидов, с. 40—45, М., 1982.
9. Доведова Е. Л., Качалова Л. М., Орлова Е. И. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 86, № 7, с. 1025—1028, 1986.
10. Лаврецкая Э. Ф., Ашмарин И. П., Калихевич В. И., Чаморовская Л. Т., Балабан П. М., Леонтьева Л. И., Захаров Н. С. Хим.-фармацевт. журн., т. 15, № 1, с. 20—23, 1981.
11. Klowans H. L., Goetz C., Nausieda P. A., Weiner W. J. Ann. Neurol., v. 2, p. 125—129, 1977.
12. Wilner K. D., Butler I. J., Seifert W. E., Clement-Cornier Y. C. Biochem. Pharmacol., v. 29, p. 701—706, 1980.
13. Jackson D. M., Walters J. R., Miller I. P. Brain Res., v. 250, p. 271—282, 1982.
14. Доведова Е. Л. Журн. невропатол. и психиатрии, т. 88, № 7, с. 19—21, 1988.
15. Громова Е. А. — В сб.: Нейромедиаторные механизмы памяти и обучения, с. 3—25, Пушкино, 1984.
16. Rogers A. W. Techniques of autoradiography, Amsterdam—London—New York, Elsevier Publishing Company, 1967.
17. Чеботарева Т. Л., Герштейн Л. М. Нейрохимия, т. 5, № 2, с. 180—184, 1986.
18. Камышева А. С. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 107, № 2, с. 209—211, 1989.
19. Raghupathy E., Peterson N., McKean C. M. Biochem. Pharmacol., v. 19, p. 993—1000, 1970.
20. Barker G. A., Santalo R., Blumenstein J. Biological Psychiatry, v. 12, p. 159—169, 1977.
21. Whalley S. A., Nimgaonkar V. L., Rajendran M. Y. Biochem. Soc. Trans., v. 15, p. 688—689, 1987.
22. Камышева А. С. — В сб.: Структурно-функциональные основы интегративной деятельности мозга, с. 103—104, М., 1988.
23. Герштейн Л. М., Сергутина А. В., Чеботарева Т. Л. — В сб.: Структурно-функциональные основы интегративной деятельности мозга, с. 103—104, М., 1988.
24. Spina M. B., Cohen G. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 86, p. 1389—1400, 1989.
25. Nakazato T., Akiyama A. Brain Res., v. 490, p. 332—338, 1989.

Поступила 26.IX.1989