

ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА НА АКТИВНОСТЬ МОНОАМИНОКСИДАЗ, АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И БИОЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ДВИГАТЕЛЬНЫХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА

ДОВЕДОВА Е. Л., ПОПОВА Н. С., КАЧАЛОВА Л. М.

Исследовали кору больших полушарий, хвостатое ядро и вентро-латеральные ядра таламуса головного мозга. Биоэлектрическую активность исследовали у собак. Активность ферментов определяли во фракциях синаптических мембран, легких и тяжелых синапсом, клеточных митохондрий мозга кролика. При воздействии «пептида дельта-сна» (ПДС) (30 мкг/кг массы тела) показана активация МАО А (субстрат—серотонин) в митохондриях таламуса и соматосенсорной области коры мозга. Это подтверждено и опытами *in vitro* (концентрация ПДС 10^{-6} — 10^{-3} М). В опытах *in vivo* активность МАО Б (субстрат—*p*-нитрофенилэтиламин) и ацетилхолинэстеразы у подопытных животных оказалась ингибированной в некоторых субклеточных фракциях, причем в неодинаковой степени в различных образованиях мозга. *In vitro* ПДС на активность указанных ферментных систем воздействия не оказывал. Под влиянием ПДС было четко выражено замедление ритмов ЭЭГ-реакций на фотостимуляцию.

Можно допустить, что ПДС способен осуществлять модуляторную или регуляторную функцию в определенных синапсах, вызывая, в частности, изменения метаболизма нейромедиаторов — субстратов исследованных ферментов.

Для изучения центральных механизмов двигательных реакций перспективным является выяснение закономерностей метаболизма нейромедиаторов в различных отделах ЦНС, относящихся к моторной системе, под влиянием некоторых нейропептидов, в частности тех, которые обладают гипногенным действием [1—3]. К таким пептидам относится и так называемый «пептид дельта-сна» (ПДС), который, вызывая гипногенный эффект, в то же время подавляет парадоксальную фазу сна и специфически модулирует механизм его медленноволновой фазы с активированием «дельта-сна» [4, 5]. Физиологическое действие ПДС при изучении на различных объектах оказалось неоднозначным и требует дальнейшего выяснения. В отношении биохимических механизмов действия ПДС информация крайне ограничена. Было показано [6], что при субохипитальном введении ПДС происходили изменения лишь концентрации белка и РНК в нейронах и глимальных клетках-сателлитах супраоптического ядра гипоталамуса, но без сдвигов содержания этих молекул в расчете на одну клетку, характерных для естественного сна.

В работе была поставлена задача выяснить влияние ПДС, синтезированного в Институте биоорганической химии им. М. М. Шемякина АН СССР [7], на активность ферментов метаболизма некоторых нейромедиаторов на субклеточном уровне с параллельным контролем биоэлектрической активности в тех же структурах головного мозга.

Материалы и методы

Исследованию подлежали корковые и подкорковые образования двигательной системы головного мозга (моторная и соматосенсорная области коры больших полушарий, хвостатое ядро и вентро-латеральные ядра таламуса). Животным (кролики, собаки) ПДС вводили в дозе 30 мкг/кг массы тела. Для выяснения механизма действия ПДС в опытах *in vitro* его использовали в концентрации 10^{-8} — 10^{-5} М. Для биохимических исследований у кроликов при помощи последовательно дифференциального и градиентного центрифугирования из гомогенатов исследуемых образований мозга изолировали митохондриальную фракцию (Мх.) и субфракции синаптических мембран (В), легких (С) и тяжелых (D) синапсом и митохондрий тел нейронов (Е). В субфракциях (1—5 мг белка/мл пробы) спектрофотометрически определяли содержание белка по Lowry и соавт. [8], активность АХЭ по Hestrin [9], МАО А (субстрат—серотонин) по Попов [10], МАО В (субстрат—*n*-нитрофенилэтиламин) по Горкину и соавт. [11].

Физиологические опыты были проведены на двух собаках с хронически вживленными электродами в указанные выше образования мозга. За 2 дня до введения ПДС ставили контрольный опыт, в котором проводили регистрацию ЭЭГ от соответствующих структур в течение 1,5—2,0 ч. В опытах с ПДС регистрацию начинали сразу после его введения и продолжали в течение того же времени. Ее осуществляли на 16-канальном чернильнопишущем энцефалографе «Альвар». Использовали би- и монополярный способы отведения. Параллельно производили регистрацию ЭМГ передних конечностей животного. Во время эксперимента собаки находились в станке в затемненной изолированной камере.

Как в контрольном опыте, так и в опыте с введенным ПДС применяли ритмическую фотостимуляцию (световые вспышки с частотой 2 в 1 с, длительность серии—3 с).

Результаты и обсуждение

При регистрации ЭЭГ до введения ПДС животные находились в бодрствующем состоянии; каких-либо существенных изменений амплитудных и частотных характеристик ЭЭГ у них не наблюдалось (рис. 1, а). Под влиянием же ПДС было четко выражено замедление ритмов ЭЭГ во всех структурах мозга (рис. 1, б).

В контрольном опыте периодически также отмечалось одновременное преобладание во всех отведениях медленных ритмов, но эти измене-

ния ЭЭГ имели место в течение сравнительно коротких отрезков времени. Если в контрольном опыте на фоне преобладания ЭЭГ медленных ритмов проводилась фотостимуляция, медленные ритмы исчезали (рис. 2, а). После введения ПДС такая же фотостимуляция не изменяла медленноволнового характера ЭЭГ (рис. 2, б). При длительной регистрации ЭЭГ периодически отмечали спонтанно двигательную активность животного, влияние которой на характер ЭЭГ оказалось сходным как в контрольном опыте, так и после введения ПДС: в обоих случаях совпадение движения с периодами преобладания в ЭЭГ медленных волн приводило к их исчезновению (рис. 3, а, б).

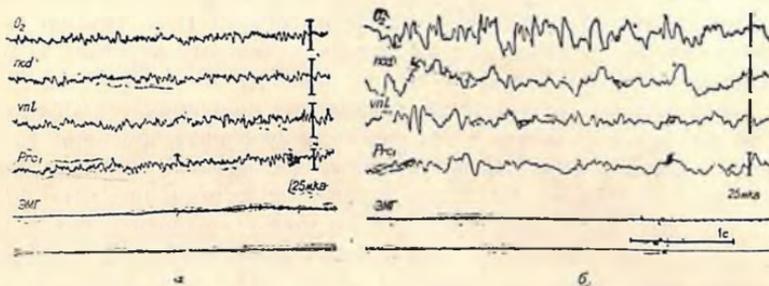


Рис. 1. Различные частотных характеристик ЭЭГ до введения ПДС (а) и через 45 мин после его введения (б). Отведения ЭЭГ: O_2 —зрительная ассоциативная область коры, ncd—хвостатое ядро, vnl—вентро-латеральное ядро таламуса, $P_r C_1$ —моторное поле коры

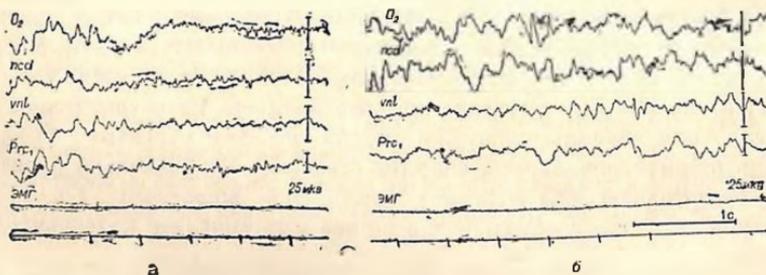


Рис. 2. Различный эффект фотостимуляции, подаваемой в момент преобладания в ЭЭГ медленных ритмов: а—контроль, б—на фоне действия ПДС

Уровень активности MAO обоих типов у контрольных животных был неодинаков в различных образованиях мозга и отдельных субклеточных структурах данного образования (табл. 1—3). АХЭ была представлена исключительно в субфракциях синаптических мембран и синапсом. При действии ПДС *in vitro* в концентрации 10^{-6} и 10^{-5} М (табл. 1—3) не наблюдали изменения активности АХЭ ни в одной из субклеточных фракций коры мозга. Активность MAO Б также практически не изменялась во всех исследованных фракциях, в то время как активность MAO А значительно повышалась в разных фракциях до

170—395% от нормы (считая последнюю за 100%), хотя и неодинаково во всех образованиях мозга в их субклеточных фракциях, причем наибольший эффект наблюдали в митохондриях (до 278—395%).

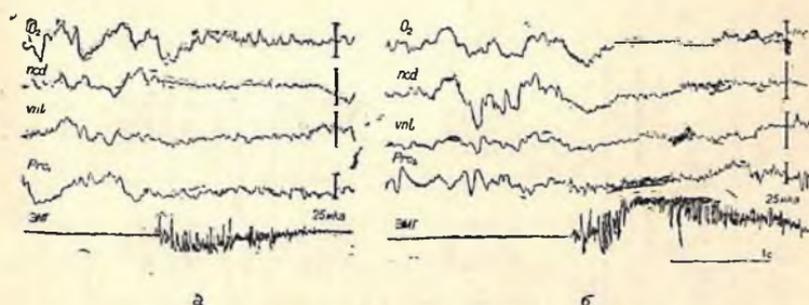


Рис. 3. Влияние спонтанной двигательной активности на частотные характеристики ЭЭГ: а — контроль, б — на фоне действия ПДС

Следует заметить, что этот эффект проявлялся уже при использовании пептида в концентрации 10^{-5} М и лишь немного возрастал при его действии в концентрации 10^{-6} М (табл. 1—3).

Под действием ПДС *in vivo* через 30 мин после субокипитального введения пептида была установлена активация MAO А в митохондриях соматосенсорной области коры больших полушарий, и особенно в митохондриях таламуса, тогда как в случае MAO Б и АХЭ ПДС ингибировал эти ферменты в некоторых субклеточных фракциях, причем в неодинаковой степени в различных структурах мозга (рис. 4).

Таким образом, воздействие ПДС при введении животному на активность MAO А и Б и АХЭ оказалось специфичным как в случае отдельных ферментных систем в одном образовании, так и в различных структурах мозга и их субклеточных фракциях. Так, в частности, активность АХЭ под влиянием ПДС при неизменности в субфракциях хвостатого ядра достоверно уменьшалась на 20—25% в легких синапсоммах и мембранах соматосенсорной области коры, особенно во фракции мембран таламуса (на 39%). В случае MAO Б ПДС свое тормозящее действие наиболее четко проявлял в субфракции митохондрий (Е).

При введении ПДС активность MAO типа А нарастала по сравнению с контролем, что было наиболее выражено в митохондриях таламуса и статистически достоверно проявлялась в клеточных митохондриях этого образования (16%). В субфракции клеточных митохондрий кожно-двигательной области коры мозга активация MAO А под влиянием ПДС составляла 141%.

Возвращаясь к данным, полученным в физиологических экспериментах, следует подчеркнуть, что при введении ПДС проявлялись изменения характера ЭЭГ, аналогичные ЭЭГ-показателям развития именно медленноволновой фазы сна. Они имели достаточно постоянный времен-

Таблица 1

Влияние пептида дельта-сна (ПДС) на активность МАО А в субклеточных фракциях *in vitro* различных образований мозга кролика

Контроль		ПДС 10^{-6} М			ПДС 10^{-5} М			
активность (E_{250}^1 /г ткани/ч)	% распре- деления	активность (E_{250}^1 /г ткани/ч)	% распре- деления	изменение активности (%)	активность (E_{250}^1 /г ткани/ч)	% распре- деления	изменение активности (%)	
Двигательная кора								
С.	20,63±3,50	43,74	42,12±7,30	42,42	205,5*	44,88±6,70	39,20	217,0*
Д.	16,61±1,00	35,00	34,5±4,90	27,31	208,0*	43,83±4,20	37,37	265,0*
Е.	10,03±0,90	21,6	27,65±2,90	29,24	269,0*	28,81±1,70	24,43	287,0*
Σ	47,27	100	103,67	100	262,0	117,52	100	219,0
Хвостатое ядро								
С.	28,70±2,50	45,08	135,92±4,80	35,67	125,0	17,80±7,00	39,00	166,0*
Д.	22,86±3,10	35,90	23,12±1,80	21,53	100,0	46,72±8,50	22,00	201,0*
Е.	12,10±11,10	19,02	13,57±2,90	42,80	360,0*	17,68±7,40	39,00	395,0*
Σ	63,66	100	102,61	100	159,0	122,20	100	191,0
Таламус								
С.	20,28±2,90	32,51	34,50±2,90	42,46	167,0	14,36±4,20	30,50	218,0*
Д.	28,02±3,50	36,56	47,70±3,50	27,63	207,0*	49,45±6,40	33,50	214,0*
Е.	19,26±1,70	30,93	50,3±6,50	29,91	262,0*	53,64±4,70	36,00	278,0*
Σ	62,56	100	132,55	100	275,0	147,35	100	243,0

* $p < 0,005$

Таблица 3

Влияние пептида дельта-сна (ПДС) *in vitro* на активность АХЭ в субклеточных фракциях различных образований мозга кролика

Контроль		ПДС 10^{-6} М			ПДС 10^{-5} М			
мкМ АХ/г ткани/ч	% распределения	мкМ АХ/г ткани/ч	% распределения	изменение активности (%)	мкМ АХ/г ткани/ч	% распределения	изменение активности (%)	
Двигательная кора								
М.х.	222,0±34,0	91,00	216,0±16,6	91,00	97,50	225,00±24,40	84,33	98,33
В.	94,2±8,8	46,67	91,00±7,80	45,73	96,86	89,50±9,70	47,16	95,56
С.	80,0±5,4	39,60	76,5±7,8	38,69	93,76	72,50±10,50	38,22	89,73
Д.	27,75±4,30	13,73	30,75±2,00	15,58	121,0	27,75±4,00	14,62	106,95
Σ	202,0	100	198,25	100	97,0	189,75	100	93,2
Хвостатое ядро								
М.х.	454,0±53,0	100	373,0±20,2	105,0	100,5	375,0±33,3	109,0	102,5
В.	203,0±4,5	44,60	152,5±9,6	38,65	99,00	152,4±12,8	37,04	99,8
С.	146,5±2,8	32,17	124,5±9,6	32,48	100,0	151,10±0,10	36,70	94,3
Д.	105,8±2,8	23,23	114,0±12,5	28,87	104,0	108,50±8,00	26,26	97,7
Σ	455,3	100	394,0	100	78,0	412,0	100	82,0
Таламус								
М.х.	280,0±12,9	106,0	208,5±38,2	138,0	110,0	199,5±26,5	135,0	106,5
В.	83,0±4,5	27,94	88,0±4,6	30,30	94,2	85,66±4,60	31,62	103,0
С.	140,0±2,8	47,09	125,25±11,00	43,25	95,4	129,0±16,2	47,62	94,75
Д.	74,3±3,1	24,97	76,50±8,70	26,44	119,0	56,25±3,90	20,76	81,05
Σ	297,3	100	289,75	100	97,1	270,91	100	91,0

ной цикл развития: через 40—50 мин после введения ПДС по всем отведениям в той или иной степени возникало преобладание медленных ритмов 3—4, 6—7 Гц, при увеличении их амплитуды (рис. 1, б) восстанавливался фоновый характер ЭЭГ через 65—70 мин после введения ПДС.

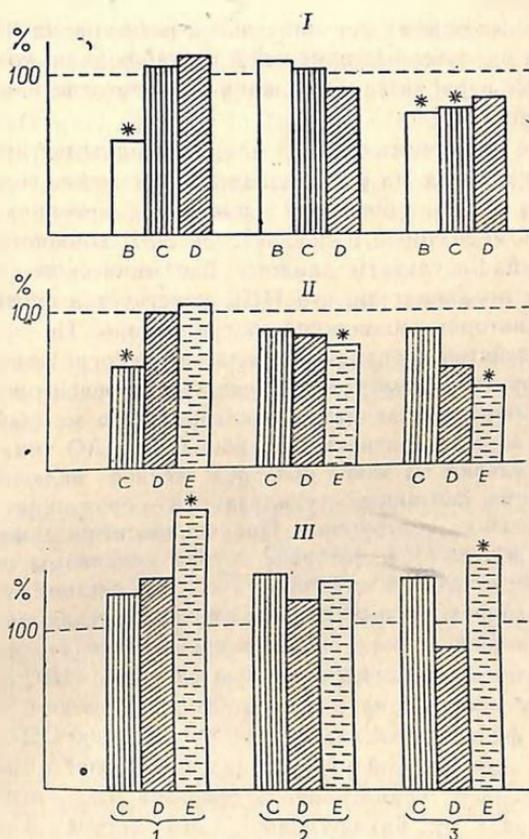


Рис. 4. Влияние ПДС на ферментативную активность в субклеточных фракциях различных образований мозга *in vivo*: I—ацетилхолинэстераза; II—MAO типа Б; III—MAO типа А; субфракции из вентро-латеральных ядер таламуса (I), из хвостатого ядра (2), из соматосенсорной области коры (3). Субфракции мембран (B), легких синапсом (C), тяжелых синапсом (D), свободных митохондрий (E)

Как было уже сказано, обнаружилось различное влияние фотостимуляции на медленные ритмы в контрольном опыте и на фоне действия ПДС: в первом случае при фотостимуляции медленные ритмы исчезали (рис. 2, а), во втором, напротив, фотостимуляция не приводила к изменениям характера ЭЭГ, то есть сохранялось преобладание в частотной характеристике ЭЭГ медленных ритмов (рис. 2, б).

Однако, судя по поведенческим показателям, этим изменениям характера ЭЭГ не соответствовало развитие состояния нормального сна у животного; на протяжении всего периода регистрации ЭЭГ уровень бодрствования животного не менялся: сохранялась ориентировочная реакция на обстановку, тонус мышц конечностей оставался без существенных изменений.

В контрольных опытах при длительной регистрации ЭЭГ без введения ПДС таких выраженных изменений не наблюдали, хотя и отмечали кратковременные периоды преобладания по всем отведениям медленно-волновой активности.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что ПДС оказывает влияние на функциональное состояние головного мозга, что проявлялось в наших опытах в вероятных изменениях метаболизма некоторых нейромедиаторов и показателей ЭЭГ корковых и подкорковых образований. Результаты данного биохимического исследования дают основание предполагать, что ПДС участвует в превращениях исследуемых медиаторов, возможно, опосредованно. Не исключено, что регулирующее действие пептида проявляется непосредственно на липопротеидную структуру мембраны определенных рецепторов, что может отражаться на обратном захвате медиатора и его метаболизме. Полученные данные *in vitro* в отношении активации MAO типа А под влиянием ПДС указывают на такое непосредственное включение данного пептида в реакции, связанные с утилизацией серотонина и поддержанием его нормального содержания. Полученные нами данные подтверждают гипотезу Jouvet [12], который, изучая механизмы сна, предположил, что сон регулируется антагонистическими системами, влияющими на различные его фазы, а именно: серотонинергическая система индуцирует медленноволновую фазу сна, норадренергическая и холинергическая системы влияют на парадоксальную фазу сна; ПДС не может вмешиваться в активность этих нейромедиаторных систем.

Некоторые физиологические данные по действию ПДС и его аналогов на нейроны виноградной улитки свидетельствуют о высокой структурной специфичности нейротропного действия этого пептида. Можно сделать заключение, что это объясняется его участием в регуляции активности ферментов метаболизма медиаторов [13, 14]. Наблюдавшееся в наших опытах небольшое снижение активности АХЭ при действии ПДС, отражающее нарушение катаболизма ацетилхолина, не выявлялось по показателям ЭЭГ и реакции животных на проприоцептивные раздражения.

Авторы выражают искреннюю благодарность акад. АМН СССР И. П. Ашмарину за постоянную консультативную помощь в осуществлении данной работы.

EFFECT OF DSIP ON THE MONOAMINOXYDASE AND ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY AND ON THE BIOELECTRIC ACTIVITY OF BRAIN MOTOR STRUCTURES

DOWEDOVA E. L., POPOVA N. S., KACHALOVA L. M.

Institute of Brain, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

The administration of Delta-Sleep Inducing Peptide—DSIP (30 mcg/kg bw) leads to activation of MAO type A (with serotonin as a substrate) in the mitochondrial fraction of brain cortical and subcortical motor structures. These data were justified in experiments *in vitro* with 10^{-6} – 10^{-5} M DSIP. On the contrary, the activities of MAO type B (with p-nitrophenylamine as a substrate) and acetylcholine esterase decrease slightly differing among various brain subcellular fractions (*in vivo*). DSIP has no effect on the activity of these enzymes *in vitro*.

The administration of DSIP markedly slows down electroencephalographic (EEG) rhythms in all structures tested and leads to disappearance of EEG response to light stimulus.

Data obtained point to the possible modulatory or regulatory effect of DSIP on synapses inducing a number of processes involved in serotonin metabolism.

ЛИТЕРАТУРА

1. Monnier M., Dubler L., Mater P., Gächter R., Tobler H., Schoenenberger G. *Experientia*, **33**, 548–552, 1976.
2. Schoenenberger G., Monnier M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 1282–1286, 1977.
3. Monnier M., Dubler L., Gächter R., Schoenenberger G. *Neurosci. Letters*, **6**, 9, 1977.
4. Богословский М. М., Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Альбертин С. В. *Ж. эвол. биох. и физиол.*, **15**, 430–432, 1979.
5. Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Воронов И. Б., Богословский М. М., Демин Н. Н., Рубинская Н. Л., Альбертин С. В. *Ж. эвол. биох. и физиол.*, **15**, 583–589, 1979.
6. Демин Н. Н., Карманова И. Г., Максимук В. Ф., Рубинская Н. Л. *Ж. эвол. биох. и физиол.*, **16**, 257–260, 1980.
7. Michaleva I. I., Sargsyan A. V., Sumskaya L. V., Balashova T. A., Deshko T. N., Efremov E. S., Ivanov V. T.—In: *Peptides, Structure and Biological Function*. Press Chemical Company, Rockford, Illinois, p. 901–904, 1979.
8. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. J. *Biol. Chem.*, **193**, 256–275, 1951.
9. Hestrin S. J. *Biol. Chem.*, **180**, 249–261, 1949.
10. Popov V., Rosler V., Thiemann C., Motthen H. *Acta biol. med. Germ.*, **26**, 239–245, 1971.
11. Горкин В. Э., Вережкина И. В., Гриднева Л. П.—В кн.: *Современные методы в биохимии*, М., Медицина, 2, с. 155–162, 1967.
12. Jouvet M.—In: *Brain and Sleep*. Erven Bohn. Amst., p. 22–38, 1974.
13. Сарссян А. С., Сумская Л. В., Александрова Н. Ю., Безруков М. В., Михалева И. И., Иванов В. Т., Балабан П. М. *Биоорганическая химия*, **8**, 1125–1149, 1981.
14. Zimmerman E. G. *Fed. Proc.*, **38**, 2286–2287, 1979.

Институт мозга АМН СССР, Москва

Поступила 20. XII 1981