

УДК 577.150.8+577.17

ДЕЙСТВИЕ L-ДОФА И 5-ГИДРОКСИТРИПТОФАНА НА АКТИВНОСТЬ МАО МОЗГА КРЫС

Войтенко Н.Н., Пилянзин А.И.

Институт цитологии и генетики СО АН СССР, Новосибирск

Изучали влияние однократного интраперитонеального и интрацеребровентрикулярного введения L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на активность МАО мозга крыс линии *Wistar*. Показано, что L-ДОФА и 5-гидрокситриптофан при обоих способах введения активировали МАО типа А и типа В; активомимин Д, введенный как интраперитонеально, так и интрацеребровентрикулярно, предотвращал активирующее действие L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на МАО типа А и типа В. Дофамин и серотонин при интрацеребровентрикулярном введении существенного влияния на МАО мозга не оказывали.

Проблема регуляции в организме активности МАО [(МАО) амин: кислород оксидоредуктаза (дезаминирующая) (содержащая флаavin)], одного из основных ферментов деградации биогенных аминов, до сих пор не вполне выяснена. Существуют малочисленные и неоднозначные данные об участии в регуляции активности МАО ее субстратов [1] серотонина и норадреналина. Имеются данные о том, что L-ДОФА, предшественник дофамина, изменяет активность МАО [2—4]. В последние годы стало известно, что [H] ДОФА связывается с негистоновыми белками хроматина [5]. Эти факты позволяют предположить, что действие L-ДОФА на активность МАО опосредовано геном и L-ДОФА может инициировать транскрипцию генов, кодирующих МАО, белки или пептиды, которые участвуют в посттранскрипционной модификации активности МАО. Данные о влиянии 5-гидрокситриптофана на активность МАО единичны и носят косвенный характер [6].

Цель настоящего исследования заключалась в изучении влияния на активность МАО биогенных аминов дофамина и серотонина и их предшественников L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана.

Материалы и методы

Работа выполнена на 4-месячных самцах крыс линии *Wistar* массой 250 г. За два дня до опыта крыс помещали в индивидуальные клетки, корм и воду не ограничивали. Опыты проводили в 10—12 ч. В первой серии опытов крысам вводили однократно интраперитонеально L-ДОФА

(«Reanal», Венгрия) в дозе 80 мг/кг за 60 мин, 5-гидрокситриптофан («Calbiochem», Швейцария) в дозе 100 мг/кг за 40 мин до декапитации. Время действия препаратов соответствовало их максимальному влиянию на уровень дофамина [7] и серотонина [8] в мозгу. Актиномицин Д («Fluka», ФРГ) вводили в этой серии опытов интраперитонеально в дозе 10 мкг/100 г [9] за 60 мин до введения L-ДОФА или 5-гидрокситриптофана. Контрольным животным интраперитонеально вводили физиологический раствор. Во второй серии опытов L-ДОФА вводили интрацеребровентрикулярно через предварительно вживленную в третий желудочек мозга канюлю в дозе 20 мкг, 5-гидрокситриптофан вводили в дозе 100 мкг в 10 мкл физиологического раствора и через 30 мин животных декапитировали. Актиномицин Д во второй серии опытов вводили интрацеребровентрикулярно [10] в дозе 1 мкг за 60 мин до интрацеребровентрикулярного введения L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана. Контрольные крысы получали актиномицин Д без последующего введения препаратов L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана.

Для разделения эффекта L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на активность MAO от эффекта дофамина и серотонина, которые образуются из L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана соответственно, в третьей серии опытов интрацеребровентрикулярно вводили дофамин гидрохлорид («Koch Light», Англия) в дозе 10 мкг в 10 мл физиологического раствора. Серотонин креатининсульфат («Reanal», Венгрия) вводили в дозе 100 мкг в таком же объеме физиологического раствора. Через 30 мин крыс декапитировали. Контрольных и подопытных крыс декапитировали в одно и то же время суток. Мозг выделяли на холоде и гомогенизировали в 0,32 М растворе сахарозы. Неразделенную фракцию митохондрий, выделенную методом дифференциального центрифугирования [11], хранили при -20° до исследования. Инкубацию препаратов митохондрий, содержащих MAO, проводили при 37° в 0,1 М $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -фосфатном буфере, pH 7,4 [12] в течение 30 мин. В качестве субстратов использовали серотонин («Reanal», Венгрия) и бензиламин (Харьковский ХФЗ), специфические субстраты MAO типов А и Б соответственно. Активность MAO выражали в нмоль аммиака на мг белка за мин. Аммиак определяли после изотермической отгонки с последующим применением реактива Несслера и измерением оптической плотности при 410 нм [13]. Белок определяли по Лоури.

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования показали, что под влиянием как L-ДОФА, так и 5-гидрокситриптофана, введенных однократно интраперитонеально, активность в мозгу крыс MAO типов А и Б существенно возрастала (табл.1). Предварительное ингибирование ДНК-зависимой РНК-полимеразы актиномицином Д [14] препятствовало активирующему действию L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на активность MAO типов А и Б, поскольку ее значение в обоих случаях под влиянием L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана

на фоне актиномицина Д не повышалось по сравнению с теми значениями, которые наблюдали у крыс в присутствии только актиномицина Д (табл.1).

Таблица 1

Влияние актиномицина Д на измененную L-ДОФА и 5-гидрокситриптофаном активность MAO мозга крыс при интраперитонеальном введении препаратов (n=5)

Серии опытов	MAO типа А	MAO типа Б
Физиологический раствор	$1,03 \pm 0,08$	$2,23 \pm 0,10$
L-ДОФА	$2,41 \pm 0,07^*$	$3,70 \pm 0,21^*$
5-гидрокситриптофан	$2,07 \pm 0,16^*$	$2,90 \pm 0,22^*$
Актиномицин Д	$2,05 \pm 0,27^*$	$1,83 \pm 0,08^*$
Актиномицин Д + L - ДОФА	$1,90 \pm 0,19$	$1,72 \pm 0,17$
Актиномицин Д + 5-гидрокситриптофан	$2,13 \pm 0,09$	$1,97 \pm 0,05$

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с физиологическим раствором.

Введенные однократно интрацеребровентрикулярно L-ДОФА и 5-гидрокситриптофан также повышали активность обоих типов MAO в головном мозгу крыс (табл.2). Актиномицин Д, введенный интрацеребровентрикулярно, как и введенный интраперитонеально, полностью предотвращал активизирующее влияние L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на MAO типов А и Б (табл.2). Полученные факты свидетельствуют о том, что L-ДОФА, 5-гидрокситриптофан и актиномицин Д оказывали сходное действие на MAO мозга крыс независимо от способа введения.

Как видно из табл. 1 и 2, актиномицин Д, введенный интраперитонеально или интрацеребровентрикулярно, существенно снижал активность MAO типа Б. Активность MAO типа А при этом существенно повышалась только при интраперитонеальном введении актиномицина Д (табл.1), а при интрацеребровентрикулярном его введении наблюдалась только лишь тенденция к ее повышению (табл.2).

Отношение активности MAO типа А к MAO типа Б в присутствии актиномицина Д увеличивалось в 2—2,5 раза и было более выражено в стволовой части мозга, чем в полушариях (табл.3).

Серотонин и дофамин вводили интрацеребровентрикулярно, так как эти препараты плохо проникают через ГЭБ. Серотонин и дофамин не оказывали существенного влияния на активность MAO типов А и Б головного мозга крыс, поскольку значения активностей MAO типов А и Б у контрольных крыс не отличались от активностей MAO мозга крыс, которым в третий желудочек мозга вводили дофамин и серотонин (табл.2).

Таблица 2

Влияние актиномицина Д на измененную L-ДОФА и 5-гидрокситриптофаном активность MAO мозга крыс при интрацеребровентрикулярном введении препаратов

Серии опытов	MAO типа А	MAO типа Б
Физиологический раствор	$0,90 \pm 0,10$ (6)	$1,15 \pm 0,09$ (6)
Дофамин	$0,95 \pm 0,07$ (6)	$1,14 \pm 0,08$ (6)
Серотонин	$1,07 \pm 0,13$ (6)	$1,23 \pm 0,21$ (5)
L-ДОФА	$2,51 \pm 0,27^*$ (6)	$2,22 \pm 0,13^*$ (4)
5-гидрокситриптофан	$2,33 \pm 0,06^*$ (4)	$1,89 \pm 0,05^*$ (4)
Актиномицин Д	$1,03 \pm 0,20$ (6)	$0,73 \pm 0,13^*$ (6)
Актиномицин Д + L-ДОФА	$1,50 \pm 0,13$ (6)	$1,02 \pm 0,21$ (5)
Актиномицин Д + 5-гидрокситриптофан	$1,10 \pm 0,06$ (5)	$1,05 \pm 0,10$ (5)

Примечание. В скобках указано число животных, * $p < 0,05$ по сравнению с физиологическим раствором.

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные показали, что однократное введение L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана оказывает активирующее действие на MAO мозга крыс. Сами нейромедиаторы—серотонин и дофамин в то же время и в тех же условиях существенного влияния на активность MAO мозга не оказывали. Под влиянием как интраперитонеального, так и интрацеребровентрикулярного введения применявшихся доз L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана существенно возрастала активность обоих типов MAO мозга крыс. Действие L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на MAO мозга крыс было опосредовано, по всей видимости, геном, поскольку актиномицин Д полностью предотвращал активирующее действие L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на MAO мозга крыс. Очевидно, L-ДОФА и 5-гидрокситриптофан за 30 мин инициируют транскрипцию генов, кодирующих индуцибельную группу MAO типов А и Б, поскольку известно, что без введения L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана для регенерации 50% активности MAO головного мозга требовалось 11 дней [15], или транскрипцию генов, кодирующих белки или пептиды, участвующие в посттранскрипционной модификации активности MAO [16—18].

Применение актиномицина Д позволило выявить сложную картину регуляции активности MAO. Так, актиномицин Д подавлял экспрессию гена, кодирующего активность MAO типа Б и усиливал экспрессию гена, кодирующего активность MAO типа А. Последнее можно объяснить подавлением актиномицином Д синтеза мРНК, которая ингибирует проявление активности MAO типа А. То есть, по всей видимости, существует определенный фактор белковой или пептидной природы, который может

ингибировать активность МАО типа А. В настоящее время известны пептиды, ингибирующие и активизирующие МАО типа А [17—19], хотя молекулярные механизмы их действия пока не известны. Тем не менее, существуют данные о регулирующем действии пептида дельта-сна на активность МАО типа А [19] и, возможно, что регуляция активности МАО осуществляется на уровне деградации фермента, так как пептид дельта-сна регулирует одновременно и протеолиз [20].

Таблица 3

Изменение отношения активностей МАО А/ МАО Б в стволе и в полушариях головного мозга крыс при интраперитонеальном введении актиномицина Д

Серии опытов	Ствол	Полушария
Физиологический раствор	0,86	0,80
Л-ДОФА	0,66	0,64
5-гидрокситриптофан	0,64	0,61
Актиномицин Д	2,02	1,49
Актиномицин Д + Л-ДОФА	1,98	1,33
Актиномицин Д + 5-гидрокситриптофан	1,89	1,76

Наши данные о повышенной активности МАО типа А под влиянием Л-ДОФА согласуются с данными предыдущих работ [21, 22], в которых показано, наряду с повышением уровня дофамина, снижение уровней норадреналина и серотонина, субстратов МАО типа А, под действием Л-ДОФА. Судя по этим фактам, Л-ДОФА является не только предшественником дофамина, повышающим его уровень в мозгу, но и фактором, обладающим способностью снижать уровни других биогенных аминов, нарушая при этом соотношения нейромедиаторов [22].

Полученные нами данные позволяют объяснить эффективность комбинированного применения Л-ДОФА и ингибиторов МАО при лечении дофаминдефицитных состояний [23]. При комбинированном применении Л-ДОФА и ингибиторов МАО содержание дофамина в мозгу увеличивается не только за счет вновь образованного дофамина из Л-ДОФА, но и за счет дофамина, защищенного ингибиторами МАО от разрушения. Наряду с этим, ингибиторы МАО препятствуют усиленному дезаминированию норадреналина и серотонина МАО, активированной Л-ДОФА, и таким образом способствуют сохранению соотношения этих нейромедиаторов [23].

Неоднозначное действие актиномицина Д на МАО типов А и Б (табл. 1 и 2) находится в соответствии с данными литературы [16—18] и подчеркивает существование разных геномных механизмов, регулирующих активности этих двух неидентичных типов МАО. Полученные нами факты свидетельствуют также о более быстром и более выраженном изменении

отношения активности MAO типа А к MAO типа Б под влиянием актиномицина Д в стволовой части мозга, где локализованы преимущественно перикарионы моноаминергических MAO-содержащих нейронов по сравнению с полушариями, которые содержат аксоны этих нейронов (табл.3). Приведенные факты служат доказательством в пользу того, что действие L-ДОФА и 5-гидрокситриптофана на MAO мозга крыс осуществляется в перикарионах MAO-содержащих нейронов на геномном уровне.

Действие L-ДОФА в зависимости от дозы может резко различаться. Так, доза 50—60 мкг/кг [4] понижала, а доза 80 мг/кг существенно повышала активность MAO типа А мозга крыс (табл.1). То есть L-ДОФА, продукт гидроксирования фенилаланина, выступает регулятором метаболизма биогенных аминов, нейромедиаторов мозга, и направленность этой регуляции определяет уровень L-ДОФА.

EFFECT OF L-DOPA AND 5-HYDROXYTRYPTOPHAN ON MONOAMINE OXIDASE ACTIVITY IN RAT BRAIN.

Voitenko N.N., Piyansin A.I.

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the USSR
Academy of Sciences, Novosibirsk.*

The effects of single intraperitoneal (*ip*) and intraventricular (*iv*) administration of L-DOPA and 5-hydroxytryptophan on MAO activity in the brain of Wistar rats were studied. L-DOPA and 5-hydroxytryptophan after either *ip* or *iv* administration activated MAO-A and MAO-B, whereas actionomycin D administered by similar routes abolished the activating effects. Serotonin and dopamine had no effect on the MAO forms after either *ip* or *iv* administration.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балаклеевский А.И., Шевченко Н.В., Корень Н.А., Петренко С.В., Переверзев В.А., Тиссари А., Джесса Дж.Л. — В сб.: Физиология и биохимия медиаторных процессов. Тезисы докл. 5-й Всесоюз. конф., ч.1, с.33, М., 1985.
2. Collins G.G.S., Pryse-Davies J., Sandler M., Southgate J. *Nature*, v.226, p.642—643, 1970.
3. Петренко С.В., Балаклеевский А.И. *Вопр. мед. химии*, т.26, N12, с.264—270, 1980.
4. Хватова Е.М., Доведова Е.Л., Михалева И.И. *Нейрохимия*, т.6, N1, с.57—63, 1987.
5. Третьяк Т.М., Архипова Л.В. *Нейрохимия*, т.4, N2, с.125—130, 1986.
6. McBride W.J., Aprison J.N. *J. Neurochem.*, v.23, p.385—391, 1974.
7. Algeri S., Cerletti S. *Eur. J. Pharmacol.*, v.27, p.191—197, 1974.
8. Trulson M.E., Jacobs B.L. *Neuropharmacol.*, v.15, p.339—344, 1976.
9. Gandhi B.S., Kanungo M.S. *Indian J. Biochem. Biophysics*, v.11, p.102—104, 1974.
10. Карасик Г.И., Корочкин Л.И., Максимовский Л.Ф. *Журн. высш. нервн. деят.—сти*, т.26, вып.5, с.1066—1073, 1976.
11. Gray E.G., Whittaker V.P. *J.Anat.*, v.96, part 1, p.79—87, 1962.
12. Горкин В.Э., Вережкина И.В., Гриднева Л.И., Жердева Л.В., Кляшторин Л.Б., Кризченкова

- Р.С., Комиссарова Н.В., Леонтьева Г.А., Романова Л.А., Северин И.С., Фейгина С.М. — В кн.: Современные методы в биохимии (под ред. В.Н.Ореховича), с.155—172, М., Медицина, 1968.
13. Силакова А.И., Труш Г.Л., Являкова А. *Вопр. мед. химии*, N8, с.538—545, 1962.
 14. Карасик Г.И., Сукоян М.А. Корочкин Л.И., Беляев Д.К. Голубица А.Н., Малецкая Е.И., Максимовский Л.Ф. *Журн. высш. нервн. деят-сти*; т.21, вып.1, с.184—189, 1971..
 15. Goridis C., Neff N.H. *J. Neurochem.*, v.18, p.1673—1682, 1971.
 16. Wahlund L.-O., Sääft J., Ross S.B., Wetterberg L. *Acta phisiol. scand.*, v.120, p.337—341, 1984.
 17. Isaac L., Schoenbeck R., Backer J., Skolnik Ph., Paul S.M. *Neurosci. Lett.*, v.66, N3, p.257—262, 1986.
 18. Камышанская Н.С., Москвитина Т.А., Позднеев В.Ф., Горкин В.З. *Нейрохимия*, т.4, N3, с.340—341, 1985.
 19. Доведова Е.Л., Попова Н.С., Качалова Л.Н. *Нейрохимия*, т.4, N2, с.138—147, 1983.
 20. Бондаренко Т.И., Грищенко Е.С., Кричевская А.А. *Нейрохимия*, т.7, N1, с.153—154, 1988.
 21. Bartholini G., Da Prada M., Pletscher A. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.20, p.228—229, 1968.
 22. Butcher L.L., Engel J., Fuxe K. *Brain Res.*, v.41, N2, p.387—411, 1972.
 23. Сэндлер М. *Журн. Всес. хим. об-ва им.Д.И.Менделеева*, т.2, с.190—196, 1976.

Поступила 17.08.1988

Березин В.А., Белик Я.В. Специфические белки нервной ткани — Киев: Наук. думка 1990(III). — 20 л—4р. 30 к.

В монографии обобщены новейшие литературные данные и результаты исследований авторов по идентификации, очистке, физико-химическим свойствам, тканевому и клеточному распределению, субклеточной локализации, функциональной роли различных специфических белков нервной ткани. Рассматриваются основные иммунохимические и физико-химические методы идентификации, очистки, изучения и количественного определения нейроспецифических белков. Особенностью монографии является то, что в ней тщательно анализируется теоретическое и практическое значение нейроспецифических белков в нейробиологии и нейропатологии. Рассматриваются особенности экспрессии нейроспецифических белков при малигнизации клеток мозга и проблемы применения этих белков в качестве маркеров при иммунохимической послеоперационной диагностике опухолей мозга. Подчеркивается перспективность использования моноклональных антител к нейроспецифическим маркерам в диагностике и иммунотерапии опухолей.