

УДК 612.821.7+557.15/17+612.8.015

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА НА СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИАМИНОВ В МОЗГУ И ПЕЧЕНИ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ДЕЙСТВИИ ХОЛОДОВОГО СТРЕССА

Бондаренко Т.И., Кричевская А.А.,
Черногубова Е.А.

Ростовский государственный университет

Однократное введение дельта-сон индуцирующего пептида в дозе 12 мкг/100 г массы животного на содержание полиаминов в печени интактных крыс не влияло, увеличивая его в мозгу в более отдаленные сроки после введения — через 1-3 суток. Введение дельта-сон индуцирующего пептида интактным животным приводило к увеличению содержания белка как в мозгу, так и в печени. Холодовой стресс вызывал уменьшение содержания белка в мозгу и печени крыс, содержание же полиаминов в мозгу при этом также снижалось, а в печени, наоборот, повышалось. Введение дельта-сон индуцирующего пептида «холодовым» животным нормализует содержание полиаминов в мозгу крыс, а также содержание путресцина и спермина в печени; содержание же спермидина при этом ниже контроля, что характерно для животных, адаптированных к действию холода.

* * *

В последние годы интенсивно изучается роль нейропептидов в модуляции процессов адаптации к меняющимся нагрузкам и условиям внешней среды [1]. Известен антистрессорный эффект вещества Р, дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) и др. [2, 3]. Нами ранее показано антистрессорное действие ДСИП в дозе 12 мкг/100 г массы животного в условиях холодового стресса [4], механизм которого пока неизвестен. В ответную реакцию организма на экстремальные воздействия вовлекаются такие жизненно важные функции клеток, как воспроизведение генетической информации и процессы биосинтеза белка. Нарушения этих процессов могут быть опосредованы также сдвигами в системах регуляции. Большое значение придается низкомолекулярным регуляторам, осуществляющим тонкий контроль внутриклеточных процессов. Такими веществами, участвующими в регуляции биосинтеза белка и нуклеиновых кислот, являются низкомолекулярные азотистые соединения — полиамины, которые известны также как соединения, нормализующие метаболизм при действии на организм экстремальных факторов среды [5]. Установлено разнообразное влияние нейропептидов на синтез РНК и белков [6]. Пептидная природа ДСИП предполагает возможность его взаимодействия с разными регуляторными системами организма.

В связи с этим было исследовано влияние ДСИП на содержание белка и полиаминов — путресцина, спермидина и спермина в мозгу и печени крыс в норме и при действии холодового стресса.

Материалы и методы

Исследование выполнено на белых беспородных крысах-самцах массой 150-180 г в зимние месяцы (декабрь—февраль) в два этапа. На первом этапе изучали влияние ДСИП на содержание белка и полиаминов в мозгу и печени интактных крыс через различные сроки после введения пептида. Подопытные животные были разделены на шесть групп, которым за 1, 3, 6 ч, 1, 2 и 3 суток до декапитации внутрибрюшинно вводили ДСИП в дозе 12 мкг/100 г массы животного. Контролем служили интактные животные, которых содержали в условиях вивария при 20—22°. На втором этапе исследования изучали влияние холодового стресса на содержание белка и полиаминов в мозгу и печени крыс и эффект ДСИП в условиях холодового стресса. В этой серии опытов подопытных животных делили на две группы: а) животные, которых содержали 3 суток в холодной камере при 0—2° (3 суток на холоде); б) животные, которым перед помещением их в холодную камеру внутрибрюшинно вводили ДСИП в дозе 12 мкг/100 г (3 суток + ДСИП). В мозгу и печени животных всех исследуемых групп определяли содержание белка методом Lowry и соавт. (1951 г.) в модификации Schacterle, Pollack [7], содержание полиаминов — методом Inoue, Mizutani [8], используя ИОХ на Dowex 50W×8 и низковольтный электрофорез на бумаге в лимоннокислом буфере при pH 3,6.

Результаты и обсуждение

Средние результаты однократного введения ДСИП интактным крысам приведены в табл.1. Они показывают, что на содержание полиаминов в печени ДСИП не влиял. В то же время было установлено, что, не приводя к изменению содержания путресцина в мозгу крыс через 1, 3 и 6 ч после введения ДСИП, через 1 сутки содержание путресцина в мозгу крыс

Таблица 1

Влияние ДСИП на содержание полиаминов в мозгу и печени крыс через различные сроки после внутрибрюшинного введения пептида (в нмоль/г ткани, $M \pm m$, $n=8$)

Исследуемое соединение	Контроль	Контроль + ДСИП (время после введения)					
		1 ч	3 ч	6 ч	1 сутки	2 суток	3 суток
		Мозг					
Путресцин	21,68 ± 1,45	21,45 ± 2,31	20,38 ± 1,44	23,49 ± 1,96	27,12 ± 2,27*	31,47 ± 3,39*	32,51 ± 3,37*
Спермидин	131,94 ± 2,5	127,65 ± 7,23	126,44 ± 6,15	133,80 ± 6,64	136,15 ± 2,29	143,92 ± 2,47*	142,20 ± 2,50*
Спермин	52,07 ± 1,27	54,22 ± 2,73	52,71 ± 2,47	50,73 ± 2,06	51,33 ± 2,05	54,15 ± 1,73	61,58 ± 2,09*
Печень							
Путресцин	47,93 ± 1,93	50,07 ± 2,74	47,22 ± 4,16	45,55 ± 2,69	47,15 ± 2,13	44,54 ± 2,00	45,04 ± 1,46
Спермидин	803,51 ± 9,6*	795,49 ± 8,63	798,65 ± 10,75	790,84 ± 10,46	802,33 ± 6,83	802,68 ± 5,30	782,55 ± 7,97
Спермин	266,07 ± 1,7	257,04 ± 8,02	261,02 ± 6,05	269,34 ± 4,44	259,08 ± 4,17	261,12 ± 6,56	270,45 ± 4,50

Примечание. Здесь и в табл.3 звездочкой отмечены статистически достоверные различия по сравнению с контролем ($p < 0,01 - 0,001$)

увеличивалось на 25,3, через 2 суток — на 46, через 3 суток — на 50,8% по сравнению с контролем. Содержание спермидина при этом в мозгу этих же животных не изменялось по сравнению с контролем через 1, 3 и 6 ч и 1 сутки после введения ДСИП, а через 2 и 3 суток имело место увеличение содержания спермидина на 9,1 и 7,8% соответственно. Наименьшее влияние ДСИП при его периферическом введении оказывало на содержание спермина в мозгу крыс. Концентрация спермина в мозгу крыс не изменялась через 1, 3, 6 ч, 1, 2 суток после введения ДСИП, лишь через 3 суток оно увеличивалось на 18,3% по сравнению с контролем. Таким образом, наибольшее увеличение содержания полиаминов в мозгу при введении ДСИП интактным животным наблюдали в более отдаленные сроки после его введения (на 3 сутки). Особенно это характерно для путресцина, в меньшей степени — для спермина.

Tabor C., Tabor U. [9] отмечали, что при стимуляции роста в биосистемах также вначале возрастала концентрация путресцина, затем наблюдали параллельное накопление спермидина и РНК; концентрация спермина повышалась несколько позже. Высказано предположение, что сАМР может быть важным фактором, оказывающим влияние на биосинтез полиаминов, повышая активность орнитиндекарбоксилазы посредством сАМР-зависимой протеинкиназы [10]. Можно допустить, что эффекты ДСИП также могут опосредоваться аденилатциклазной реакцией.

Таблица 2

Влияние ДСИП на содержание белка в мозгу и печени крыс через различные сроки после внутрибрюшинного введения 12 мкг/100 г пептида и при действии холодового стресса (в мг/1г ткани. $\bar{M} \pm m$, $n=8$)

Исследуемая ткань	Контроль	Контроль + ДСИП						
		через 1 ч после введения	через 3 ч после введения	через 1 сут. после введения	через 2 суток после введения	через 3 суток после введения	3-е суток холода	3-е суток холода + ДСИП
Мозг	125,41 ± 2,67	133,99 ± 1,24	139,84 ± 2,87	147,76 ± 2,17	162,14 ± 2,61	182,43 ± 5,39	105,49 ± 2,05	137,33 ± 3,03
Печень	188,45 ± 2,72	200,28 ± 2,76	202,62 ± 3,48	214,23 ± 3,64	227,84 ± 4,73	260,66 ± 8,37	176,81 ± 2,44	206,25 ± 3,11

Примечание. Все различия по отношению к контролю статистически достоверны ($p < 0,01 - 0,001$)

Повышение содержания полиаминов должно повлечь за собой активацию синтеза как нуклеиновых кислот, так и белков в мозгу. Нами показано (табл. 2), что через 1 ч после введения ДСИП интактным животным содержание белка в мозгу увеличивается на 7, через 3 ч — на 11, через 1 сутки — на 18, через 2 суток — на 29%, через 3 суток наблюдается самое значительное увеличение содержания белка — на 45% по сравнению с контролем. Однократное введение ДСИП в дозе 12 мкг/100 г интактным животным приводит к увеличению содержания белка не только в мозгу, но и в печени этих же животных. Через 1 ч после введения 12 мкг/100 г ДСИП содержание общего белка в печени крыс увеличивается на 6, через 3 ч — на 7, через 1 сутки — на 14, через 2 суток — на 21, через 3 суток — на 38% по сравнению с контролем. Таким образом, введение ДСИП

приводит к повышению содержания белка как в мозгу, так и в печени интактных крыс, причем максимальное увеличение содержания белка и в мозгу, и в печени происходит через 3 суток после введения ДСИП. В связи с тем, что содержание белка увеличивается не только в мозгу, но и в печени, где уровень полиаминов при введении ДСИП не изменяется, можно предположить, что в регуляции биосинтеза белка при введении ДСИП включаются и другие механизмы регуляции биосинтеза белка.

Рассматривая эти данные, следует учитывать несколько возможных механизмов. Во-первых, объектом фосфорилирования протеинкиназами, «включаемыми» посредством регуляторных пептидов, могут быть белки-регуляторы трансляции и транскрипции. Во-вторых, значительные изменения содержания Ca^{2+} и других ионов, миграции которых возникают в результате модификации мембранных белков, могут порождать другие процессы, ведущие в конечном счете к изменению скорости транскрипции тех или иных генов или к изменениям скорости трансляции (менее специфичным) [11]. В-третьих, особого внимания заслуживает установленное недавно явление интернализации рецептор-лигандных комплексов и сведения о наличии в оболочке ядра и в хроматине соединений, способных специфически связывать регуляторные пептиды. Кроме того, эффект ДСИП в регуляции активности генома клеток может быть опосредован участием в этих процессах катехоламинов. Нами ранее показано резкое увеличение содержания катехоламинов в мозгу и печени крыс после введения ДСИП [12]. Что касается механизмов участия катехоламинов в регуляции активности генома клеток, то они общеизвестны [13]. Кроме того, в опытах *in vitro* показана способность полиаминов усиливать ацетилирование фракции гистонов, связанная либо с активацией ацетилирующих ферментов, либо с увеличением доступности этих фракций для ферментов [14]. Ацетилирование остатков лизина и аргинина приводит к уменьшению общего положительного заряда основного белка. Это должно ослаблять взаимодействие между гистонами и отрицательно заряженной ДНК и способствовать активации репрессированных генных локусов.

Меерсон [15], установив, что различные приспособительные реакции сопровождаются изменением активности синтеза нуклеиновых кислот и белков, считает, что именно эти процессы лежат в основе развития стресс-реакции и адаптации организма. Нарушение синтеза белков может быть опосредовано сдвигами в системах его регуляции, в которых важная роль принадлежит полиаминам.

При действии холодового стресса содержание общего белка в мозгу крыс уменьшается на 16, а в печени — на 6% по сравнению с контролем (табл.2). В первые дни холодового воздействия отмечается снижение содержания полиаминов в ткани мозга крыс; содержание путресцина снижается на 55,1, спермидина — на 13,8, спермина — на 32,7% по сравнению с контролем (табл.3). Так как стрессорные изменения в организме при действии холода сопровождаются увеличением основного обмена, то естественно было ожидать повышение содержания полиаминов в печени, являющейся важным регулятором обмена. Содержание полиаминов в печени крыс при действии холода увеличивается по сравнению с контролем. Следует отметить, что для спермина при действии холода

обнаружено самое значительное повышение концентрации в печени крыс — на 61,9% по сравнению с контролем. Очевидно, пул спермина в системе полиаминов наиболее чувствителен к действию холода. В меньшей степени холодовое воздействие влияет на концентрацию путресцина и спермидина, содержание которых в печени крыс увеличивается на 16,7 и 27,8% по сравнению с контролем (табл.3). Не исключено, что поддержание повышенного уровня спермина осуществляется за счет его предшественников — спермидина и путресцина. Повышенный уровень спермина является, вероятно, одной из причин усиления синтеза ДНК и белка в печени, стимуляции деления ее клеток у животных, подвергнутых действию холода. Так, было показано [16], что выдерживание животных на холоде приводит к увеличению веса печени, количества клеток и содержания в ней ДНК. Использование ингибиторов синтеза полиаминов позволило установить, что увеличение синтеза полиаминов является не побочным эффектом, а необходимой предпосылкой деления клеток и выступает в роли инициатора синтеза ДНК [17]. Неодинаковая компартиментализация спермидина и спермина в клетках млекопитающих позволяет предположить различие их функций. Так, спермин в большей степени, чем спермидин, ассоциирован с ядрами, в частности с хроматином, что свидетельствует о его связи с метаболизмом ДНК, содержание спермина в ядрах клеток резко повышается при стимуляции синтеза ДНК [18].

Таблица 3

Влияние ДСИП на содержание полиаминов в мозгу и печени крыс при действии холодового стресса (в нмоль/г ткани, $M \pm m$, $n=8$)

Исследуемое соединение	Контроль	Контроль + ДСИП	3-е суток холода	3-е суток холода + ДСИП
		Мозг		
Путресцин	21,68 $\pm$ 1,45	32,51 $\pm$ 3,37*	9,73 $\pm$ 0,94*	21,95 $\pm$ 1,85
Спермидин	131,94 $\pm$ 2,53	142,20 $\pm$ 2,50*	113,76 $\pm$ 4,46*	132,11 $\pm$ 2,38
Спермин	52,07 $\pm$ 1,27	61,58 $\pm$ 2,09*	35,17 $\pm$ 2,67*	55,20 $\pm$ 1,68
		Печень		
Путресцин	47,93 $\pm$ 1,93	45,04 $\pm$ 1,46	55,95 $\pm$ 2,08*	47,55 $\pm$ 1,98
Спермидин	803,51 $\pm$ 9,65	782,55 $\pm$ 7,97	1027,01 $\pm$ 36,96*	529,41 $\pm$ 7,23*
Спермин	266,07 $\pm$ 1,75	270,45 $\pm$ 4,50	430,78 $\pm$ 9,93*	268,18 $\pm$ 4,28

Причины, обуславливающие изменение содержания полиаминов в мозгу и печени крыс, неизвестны, но можно предположить, что под действием холода изменяется активность ферментов синтеза полиаминов: орнитиндекарбоксилазы (ОДК), спермидинсинтазы и сперминсинтазы. Концентрация полиаминов в тканях регулируется сложной цепью ферментативных реакций, первым звеном которой можно считать расщепление аргинина. Активность аргиназы крыс при действии холода претерпевает глубокие органоспецифические изменения — в печени она возрастает, в мозгу, наоборот, снижается [19]. Это может привести к резкому повышению или понижению содержания орнитина, являющегося непосредственным предшественником полиаминов в мозгу. В этой связи привлекают внимание результаты исследования на линии клеток млекопитающих, в которых отсутствовала аргиназная активность; удаление из среды экзогенных орнитина и полиаминов приводило к полному исчезновению в этих клетках путресцина, спермидина, концентрация же спермина уменьшается

лишь в небольшой степени [20]. Поскольку на пути синтеза полиаминов ОДК находится ближе к спермидину, чем к спермину, содержание спермидина в большей степени зависит от активности этого фермента, чем содержание спермина, а устойчивость сперминсинтетазы больше по сравнению со спермидинсинтетазой.

Введение ДСИП «холодовым» животным нормализовало содержание полиаминов в мозгу крыс. Вероятно, в результате введения ДСИП запускается комплекс биохимических реакций, препятствующих резкому нарушению белкового синтеза в мозгу. Однократное введение ДСИП «холодовым» животным приводит к увеличению содержания белка в мозгу и печени на 9% по сравнению с контролем. Введение ДСИП «холодовым» животным нормализует также содержание путресцина в печени крыс, однако содержание спермидина остается на 34,1% ниже контроля. Это может быть связано с тем, что аргиназа печени в отличие от аргиназы мозга активируется гормонами системы гипофиз—надпочечники [19, 22], а ДСИП в свою очередь может выступать в качестве гормона и обладает выраженным симпатoadреналовым эффектом [3].

Адаптация к холоду у крыс в естественных условиях эксперимента достигается не ранее 45 суток. Полученные нами данные по содержанию полиаминов в мозгу и печени «холодовых» крыс при введении ДСИП совпадают с результатами исследования Цветненко [21] по содержанию полиаминов в мозгу и печени адаптированных к действию холода животных.

Таким образом, ДСИП в дозе 12 мкг/100 г при периферическом введении приближает животных к наступлению холодовой адаптации уже на 3 сутки действия холода. Адаптогенное действие ДСИП выражается в ускорении и модификации течения холодовой адаптации путем нормализации ряда биохимических процессов, в том числе и в нормализации содержания полиаминов в тканях крыс.

INFLUENCE OF DELTA-SLEEP INDUCING PEPTIDE ONE THE POLYAMINE LEVEL OF RAT BRAIN AND LIVER IN THE NORM AND UNDER COLD STRESS

Bondarenko T. I., Krichevskaya A. A.,
Chernogubova E. A.

*Department of Biochemistry and Biotechnology,
Rostov State University, Rostov*

Single administration of delta-sleep inducing peptide (DSIP) at a dose of 12 μ g per 100 g of rat body weight did not change polyamine level in rat liver. The increased polyamine level was observed 1—3 days after DSIP injection in intact rat brain. DSIP administration to intact rats increased the protein content both in brain and liver. Under cold stress conditions protein content decreased both in brain and liver, whereas concentration of polyamine decreased in brain and increased in liver. DSIP injection to animals kept under cold conditions restored the level of polyamine in rat brain as well as putrescine and spermine in liver. The spermidine level was lower by 34,1% in animals kept under cold stress conditions.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бахарева В.Д. — В кн.: Компоненты адаптационного процесса, с.53—69. Л., Изд-во ЛГУ, 1984.
2. Эме П., Бинерт М., Хехт К., Бергман Ю. Вещество Р. Некоторые проблемы химии, биохимии, фармакологии, физиологии и патофизиологии, Рига, Зинатне, 1984.
3. Graf M.V., Kastin A.J. Peptides, v.7, p.1165—1187, 1986.
4. Бондаренко Т.И., Кричевская А.А., Крупеникова Е.Ю., Михалева И.И. Физиол. журн. СССР, т.71, N3, с.279—282, 1985.
5. Кричевская А.А., Лукаш А.И., Шугалей В.С., Бондаренко Т.И. Аминокислоты, их производные и регуляция метаболизма, Ростов-на-Дону, Изд-во РГУ, 1983.
6. Ашмарин И.П., Каменская М.А. Нейропептиды в синаптической передаче. Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных, М., ВИНТИ, 1988.
7. Schacterle J.R., Pollack R.J. Anal. Biochem., v.51, N2, p.654—655, 1973.
8. Inoue H., Mizutani A.A. Anal. Biochem., v.56, N2, p.408—416, 1973.
9. Tabor C.W., Tabor U. Ann. Rev. Biochem., v.53, p.749—790, 1984.
10. Russell D.H., Durie B.G. Polyamines as biochemical markers of normal and malignant growth, New York, Raven Press, 1978.
11. Greenberg M.E., Ziff E.B., Green L.A. Science, v.234, N4772, p.80—83, 1986.
12. Бондаренко Т.И., Кричевская А.А., Шейкина И.В., Кирюхина Е.В. Физиол. журн. СССР, 1988.
13. Божко Г.Х. Нейрохимия, т.4, N4, с.442—455, 1985.
14. Moruzzi G., Caldarera C.M., Casti A. Mol. and Cell. Biochem., v.3, N2, p.153—161, 1974.
15. Meerсон Ф.З. Адаптация, стресс и профилактика, М., Наука, 1982.
16. Holeckova E., Bondusova M. Physiol. bohemoslov., v.24, N4, p.311—313, 1975.
17. Boynton A., Whitfield T., Isaacs R. Cell. phisiol., v.89, N3, p.441—448, 1977.
18. Mach M., Ebert P., Popp R., Ogilvie A. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v.104, N4, p.1327—1334, 1982.
19. Шугалей В.С., Козина Л.С. Физиол. журн. СССР, т.63, N8, с.1199—1202, 1977.
20. Pohjanpelto P. Exp. Cell. Res., v.141, N2, p.333—339, 1982.
21. Цаеценко Е.З. Полиамины мозга и печени животных при действии гипероксии и низкой температуры среды. Автореферат канд. дисс., Ереван, 1980.
22. Давтян М.А., Петросян Л.А. Биол. журн. Армении, т.23 N5, с.99—102, 1970.

Поступила 19.03.1989