



УДК 612.822.1 : 577.175.823; 615.212.7 : 547.95

ПРОЛОНГИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ТЕТРАПЕПТИДАМИДА НА ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА БЕЛКОВ И МЕДИАТОРОВ В ОТДЕЛЬНЫХ МИКРОСТРУКТУРАХ МОЗГА

ГЕРШТЕИН Л. М., ДОВЕДОВА Е. Л., УЗБЕКОВ М. Г., ГОЛНКОВА Т. Л.,
СЕРГУТИНА А. В., АШМАРИН И. П.

Институт мозга ВНИЦЗ АМН СССР, Москва

По прошествии длительного периода в 3—5 суток после введения аналога энкефалина $\text{Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH}_2$ выявлены существенные изменения систем синтеза и деградации моноаминов, АХЭ, а также обмена белков в структурах двигательной системы мозга кроликов.

Вызванное тетрапептидамом длительное изменение двигательных функций может быть обусловлено специфической реакцией со стороны корково-подкорковых структур двигательной системы. При этом наблюдаются изменения как со стороны холин- и моноаминергических систем, так и обмена белков и активности некоторых протеаз.

Разносторонние исследования опиоидных пептидов показали, что они во многом определяют и регулируют эмоциональное поведение, болевую чувствительность и связаны с механизмами памяти. Предполагается их участие в патогенезе ряда нервно-психических заболеваний. У экспериментальных животных введение опиоидных пептидов вызывает наряду с анальгезией подавление общей подвижности, асимметрию конечностей и даже кататоническое состояние, которое, по мнению Bloom [1], напоминает состояние кататонической шизофрении.

Простейшие природные опиоидные пептиды весьма нестабильны в организме. Поэтому в эксперименте предпочтительно использование относительно устойчивых синтетических аналогов энкефалинов, одним из которых является синтетический тетрапептидамид $\text{Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH}_2$ (ТПА). Кроме быстро возникающего и длящегося до 60 мин анальгетического действия, был выявлен удивительно длительный—в течение недель—тормозный эффект ТПА на двигательную активность животных [2—6].

Если судить по аналогии с другими опиоидами, то продолжительность анальгезии коррелирует с периодом их полураспада в организме. Такие опиоидные пептиды, как эндорфины, вызывающие наиболее длительную (2 ч) анальгезию, имеют период полураспада порядка нескольких часов. Поэтому уже через сутки средние концентрации их в орга-

лизме должны быть в тысячи раз меньше исходных. Сохранение физиологических эффектов более чем на 3—5 суток предполагает либо связывание и длительное сохранение пептида в каких-то структурах, либо возникновение вторичных длительных патологических процессов. Это обуславливает необходимость углубленного изучения биохимических изменений в более длительные сроки после введения пептида. В задачу данного исследования входило изучение действия ТПА на обмен некоторых белков и нейромедиаторов двигательной системы мозга в течение длительного периода, (3—5 суток) после введения пептида.

Материалы и методы

Кроликам вводили подкожно ТПА, синтезированный в лаборатории синтеза белка ВКНЦ АМН СССР, из расчета 500 мкг/кг массы животного (пептид разводили в 1 мл физиологического раствора). Через 3—5 суток после инъекции ТПА животных забивали, так как по физиоло-

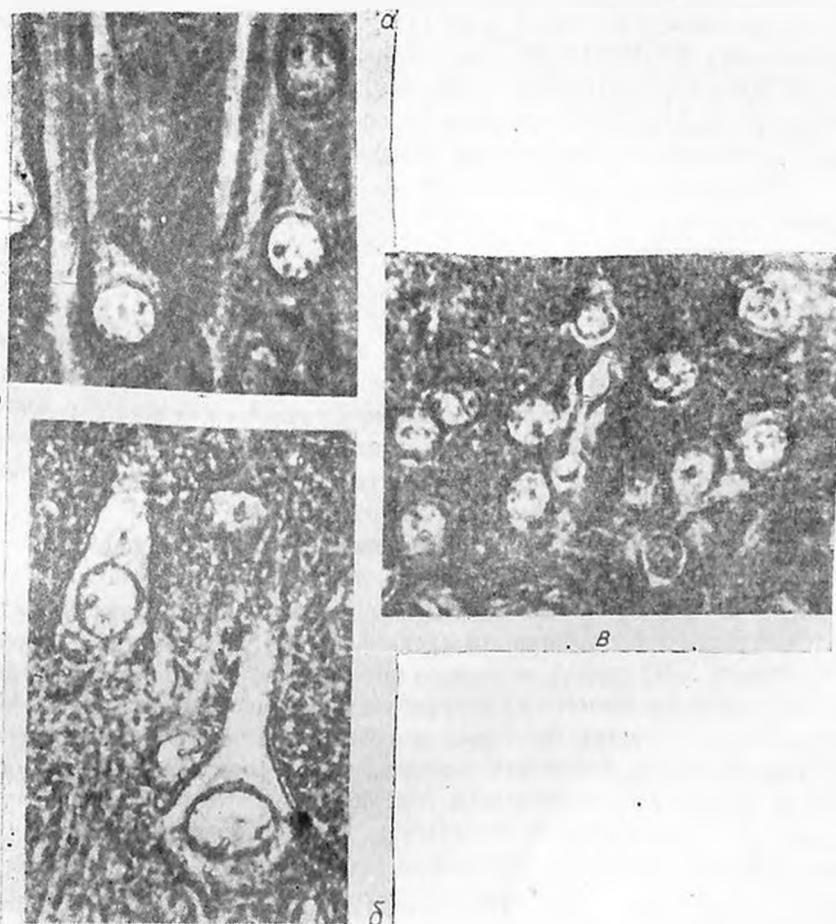


Рис. 1. Микрофото нейронов III (а) и V (б) слоев сенсомоторной области коры больших полушарий и хвостатого ядра (в) мозга крысы. Увеличение об. 40.

гическим данным в это время еще отмечаются расстройтва со стороны двигательных функций, а анальгетический эффект уже не проявляется. Были исследованы сенсомоторная область коры больших полушарий и хвостатое ядро (рис. 1). В субфракциях синаптических мембран (В), синапсом (С, D) и митохондрий (Е), выделяемых в градиенте плотности сахарозы (0,8—1,4 М), спектрофотометрически определяли активность АХЭ [10] и МАО типа А (субстрат серотонин) [11] и типа В (субстрат—*n*-нитрофенилэтиламин) [12]. Во фракции синапсом определяли спектрофлуориметрически активность триптофангидроксилазы и содержание серотонина [13]. Результаты определения выражали в процентах У. А. ферментов по отношению к контролю, принятому за 100%. Количественными цитохимическими методами определяли активность аминопептидазы (АМП) [14], кислой фосфатазы (КФ) [15], глутаматдегидрогеназы (ГДГ) [16], АХЭ [17], МАО [18] на люминесцентном микроскопе ЛЮМАМ в усл. ед. опт. пл. при длине волны для АМП—550, КФ—567, ГДГ—589, АХЭ—486, МАО—590 нм. Интерферометрически по сухой массе вещества определяли белок (содержание и концентрацию) с одновременным определением размеров нейронов [17].

Экспериментальные данные обработаны статистически по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты исследования

Под влиянием ТПА через 3-е суток при послойном цитохимическом определении АХЭ (рис. 2) в слоях III и V сенсомоторной коры уровень активности фермента достоверно снижен, в то время как в головке хвостатого ядра значительно повышен. Противоположно направленные изменения имеют место в уровне активности МАО: она возрастает в обоих слоях коры и снижается в головке хвостатого ядра.

Исследование этих же ферментов биохимически в субфракциях показало в общем сходную направленность изменений. При этом, однако, выявлены особенности, относящиеся не только к исследованным структурам, но и к субстратной специфичности. В сенсомоторной коре активность МАО типа А достоверно повышена во всех субфракциях, а МАО типа В практически не изменяется. Достоверное же снижение активности АХЭ происходит только в субфракции тяжелых синапсом. В хвостатом ядре активность исследованных форм МАО изменяется достоверно, но разнонаправленно. Активность АХЭ уменьшается за счет изменений в синапсомах, выделяемых, в отличие от цитохимических определений, из всего хвостатого ядра (головка, тело) (рис. 3). Фермент синтеза серотонина—триптофангидроксилаза—резко активируется в коре, но содержание серотонина увеличивается недостоверно (рис. 4), вероятно, потому, что при этом резко возрастает и активность МАО типа А (рис. 3), то есть активируются одновременно системы синтеза и распада этого медиатора (рис. 3.4).

В хвостатом ядре уровень активности исследуемых ферментов изменяется в противоположном направлении. Триптофангидроксилаза инги-

бируется, а МАО типа А активируется, что вызывает достоверное уменьшение содержания серотонина (рис. 3, 4).

При исследовании ряда показателей, характеризующих обмен белков, было обнаружено, что под влиянием ТПА в слоях III и V сенсомоторной коры наблюдается достоверное повышение активности АМП и снижение ГДГ, тогда как уровень активности КФ в слое III не изменяется, а в слое V достоверно повышается. В хвостатом ядре уровень ак-

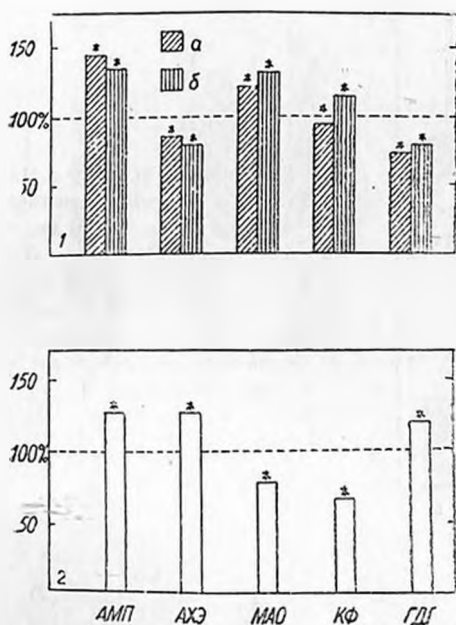


Рис. 2. Изменение активности аминотерминазы (АМП), АХЭ, МАО, кислой фосфатазы (КФ) и глутаматдегидрогеназы (ГДГ) в слоях III (а) и V (б) сенсомоторной коры (1) и хвостатого ядра (2) под влиянием ТПА (в % к контролю);

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

тивности АМП повышается так же, как и в коре, тогда как изменения ГДГ и КФ имеют обратную направленность по сравнению с корой: активность ГДГ повышена, а КФ снижена (рис. 2). Наблюдаются и послойные изменения содержания структурированных белков, определяемых в цитоплазме и ядрах нейронов сенсомоторной области коры. Оказалось (рис. 5), что содержание белка снижается на 15% в цитоплазме нейронов слоя V, а в слое III каких-либо изменений не наблюдается. При этом существенно уменьшаются и размеры цитоплазмы: в слое III—на 17, а в слое V—на 19,5%. В процесс вовлекается и ядро (рис. 6), однако имеются определенные отличия в его реакции по сравнению с цитоплазмой. В слое III содержание белка в ядрах нейронов возрастало на 15,8, тогда как в цитоплазме этих нейронов оно снижалось достоверно на 15%. Размеры ядер этих нейронов в слое III не изменялись, а в слое V уменьшались на 11,5% (рис. 6).

Обсуждение результатов

Анализ полученных экспериментальных данных показывает, что ТПА—один из простейших аналогов опиоидных пептидов—даже по истечении 3—5 суток после однократного введения в дозе 500 мкг/кг

массы оказывает выраженное влияние на обмен нейромедиаторов и пептидов. При этом проявляется определенная специфика его действия на клеточном и субклеточном уровнях. Так, в большей мере по изученным

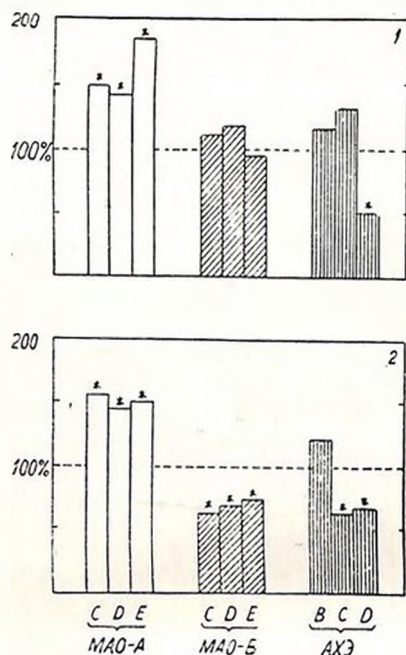


Рис. 3. Изменение активности MAO и АХЭ в субклеточных фракциях сенсомоторной коры (1) и хвостатого ядра (2) под действием ТПА. В, С, D, E—соответственно субфракции синаптических мембран легких, тяжелых синапсом, свободных митохондрий нейронов. *обозначает то же, что и на рис. 2.

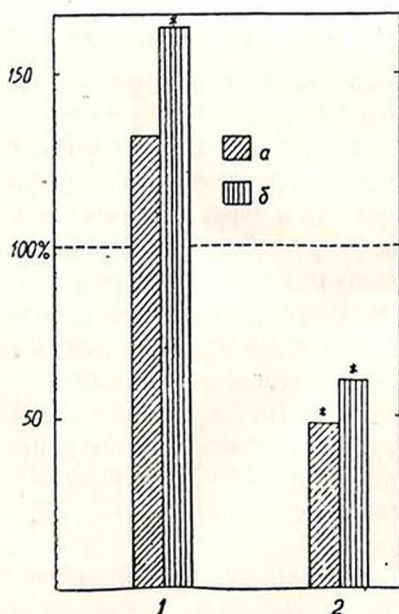


Рис. 4. Изменения содержания серотонина (а) и активности триптофан-5-гидроксилазы (б) в синапсом сенсомоторной коры (1) и хвостатого ядра (2) под влиянием ТПА (в % к контролю). *обозначает то же, что и на рис. 2.

показателям на действие ТПА реагируют нейроны, выполняющие интегративно-пусковые функции по сравнению с ассоциативными. В разной степени реагируют также субклеточные фракции (В, С, D, E). Обнаруженные изменения определяются и субстратной специфичностью

МАО типа А, а не Б. Таким образом, выявлены сложные взаимоотношения в реакции отдельных типов нейронов и их субклеточных компонентов на действие ТПА.

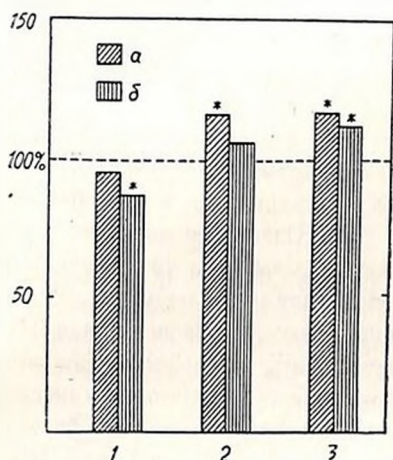


Рис. 5. Изменение размеров нейронов (1), содержания (2) и концентрации белка (3) в слоях III (a) и V (b) сенсомоторной коры под действием ТПА (в % к контролю). *обозначает то же, что и на рис. 2.

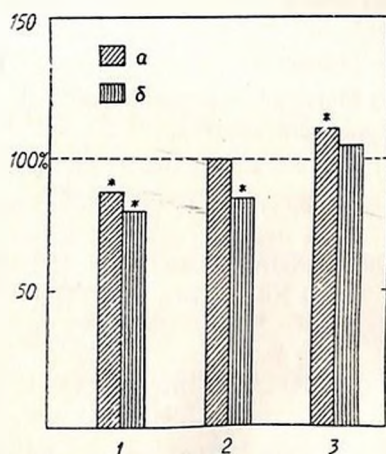


Рис. 6. Изменение размеров ядер (1), содержания (2) и концентрации (3) белка в ядрах нейронов слоев III (a) и V (b) сенсомоторной коры под действием ТПА (в % к контролю). *обозначает то же, что и на рис. 2.

Известно, что морфин, Мef-энкефалин и его синтетические аналоги стимулируют высвобождение серотонина из срезов мозга [20]. Такой же эффект получен на синапсосомах [21], из которых под действием морфина высвобождался серотонин. При этом тормозилось его связывание с серотонинсвязывающим белком растворимой фракции синапсосом. Можно предположить, что высвобождение серотонина из мест хранения повышает его доступность для метаболического действия МАО.

Полученные данные свидетельствуют о том, что ТПА оказывает влияние не только на обмен нейромедиаторов, но и определенным образом затрагивает и обмен некоторых ферментов и белков, влияя на активность АМП, содержание и концентрацию структурированных и мембранных белков цитоплазмы и ядер. Последнее, вероятно, и определяет установленное изменение размеров отдельных компонентов нейро-

на. С нашими результатами согласуются данные Кругликова и соавт. [22] о том, что под влиянием Met-энкефалина усиливается включение ^{14}C -лейцина в нерастворимые белки глиноказпа и базальных ганглиев.

На основании полученных данных можно сделать общее заключение, что вызванное ТПА длительное изменение двигательных функций определяется специфической реакцией со стороны корково-подкорковых структур двигательной системы; при этом наблюдается изменение как со стороны холин- и моноаминергических систем, так и обмена белков и активности некоторых протеаз.

Особого обсуждения заслуживает вопрос о сроках после введения ТПА, при которых регистрируются столь выраженные и многообразные биохимические эффекты. В нашем распоряжении нет конкретных данных о метаболической стабильности ТПА. Однако по аналогии с другими опиидными пептидами и их производными, а также принимая во внимание сроки появления и исчезновения наиболее изученного эффекта (противоболевое действие) опиинов, характерного и для ТПА, можно с большей вероятностью предположить, что к 3-м суткам после введения общее содержание ТПА в организме будет ничтожным по сравнению с исходным. Следовательно, наблюдаемые на 3-и сутки физиологические и биохимические явления можно истолковать либо как следствие особо длительного сохранения ТПА в каких-то определенных структурах, либо как результат включения сложных механизмов последствия («запоминание воздействия») ТПА. Более вероятным представляется второе объяснение, однако для его утверждения необходимы дальнейшие исследования.

Выражаем искреннюю благодарность доктору хим. наук М. И. Титову за предоставление препарата ТПА.

PROLONGED ACTION OF TETRAPEPTIDE AMIDE ON PROTEIN AND NEUROTRANSMITTER METABOLISM IN DIFFERENT BRAIN ULTRASTRUCTURES

GERSTEIN L. M., DOVEDOVA E. L., UZBEKOV M. G., GOLIKOVA T. L.,
SERGUTINA A. V., ASCIMARIN I. P.

Brain Research Institute, All-Union Research Center of Mental
Health, USSR Academy of Medical Sciences, Moscow

Essential changes in the metabolism of neurotransmitters and proteins have been detected in rabbit brain motor cortex and nucleus caudatus 3—5 days after administration of a tetrapeptide amide Tyr-D-Ala-Gly-Phe-NH₂ (TPA), the analogue of enkephalins (500 mcg/kg animal b.w.). It is possible to conclude that TPA-induced long-lasting changes in the motor functions are the result of specific reaction of the cortical and subcortical structures of the motor system. They are followed by the changes both in the state of the cholinergic and monoaminergic system and in the metabolism of proteins.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Bloom F. Science, 194, 630—632, 1976.
2. Анохина В. В. Канд. дис. Синтез и исследование свойств энкефалинов и их структурных аналогов. Л., 1981.
3. Brase D. A. Adv. Biochem. Psychopharmacol., 20, 409—428, 1979.
4. Kastin A. J., Olson R. D., Schally A. V., Coy D. H. Life Sci., 25, 401—414, 1979.
5. Katz R. J., Gelhard J. Behav. Biol., 24, 338—348, 1978.
6. Ведерникова Н. Н., Мейский А. Н. Успехи соврем. биол., 91, 3, 380—392, 1981.
7. Fujino M., Shinagawa S., Kawai K., Yskii H. Naturwissenschaften, 66, 625—626, 1979.
8. Renaud L. P., Blume H. W., Pittman O. J.—In: Biol. cell. process neurosecret. hypothalam. Colloq., Bordeaux, 1977, p. 669—680. Paris, 1978.
9. Узбеков М. Г. Бюл. эксперим. биол. и мед., 95, 2, 38—40, 1983.
1. Hestrin S. J. J. Biol. Chem., 180, 249—261, 1949.
1. Popov V., Roseler C., Thiemann H., Matthies H. Acta biol. et med. ger., 26, 239—245, 1971.
2. Горкиа В. З., Веревкина Н. В., Гриднева Л. Н., Жердева Л. В., Кляшторин Л. Б., Кривченко Ф. С., Қожиссарова Н. В., Леонтьева Г. А., Романова Л. А., Северина Н. С., Фейгина С. М.—В кн.: Современные методы в биохимии, с. 155—161, М., 1967.
3. Узбеков М. Г. Онтогенез, 12, 1, 58—65, 1981.
4. Герштейн Л. М. Цитология, 7, 6, 769—773, 1965.
5. Лунна Х.—В кн.: Основы гистохимии, с. 223—224, М., Мир, 1980.
3. Rubinstein L., Klatzo J., Miguel J. J. Neuropathol. a. Exptl. Neurol., 21, 116—136, 1962.
4. Karnovsky M. J., Roots L. A. J. Histochem. Cytochem., 12, 219—221, 1964.
5. Glenner G. G., Burtner H. J., Brown G. W. J. Histochem. Cytochem., 5, 591—600, 1957.
3. Бродский В. Я. Трофика клетки, М., Наука, 1966.
1. Ryescck C. J., Burns S., Morris R. Neurosci. Lett., 22, 313—318, 1981.
4. Gintzler A. R., Tamir H. Brain Res, 149, 519—524, 1978.
2. Кругликов Р. Н., Гольдберг М. Б., Мойзелис М. Я., Заблудовский А. Л. Изв. АН СССР, сер. биол. н., 5, 778—781, 1980.

Поступила 20. VII 1983