



## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ L-ДОФА С ВНУТРИКЛЕТОЧНЫМИ СТРУКТУРАМИ МОЗГА И ПЕЧЕНИ КРЫС

ТРЕТЬЯК Т. М., АРХИПОВА Л. В.

Институт биологической физики АН СССР, Пушкино

Обнаружено, что 3Н-ДОФА при внутрибрюшинном введении может проникать в клетки мозга и печени и взаимодействовать с белками хроматина. Предварительное насыщение организма перидоактивным ДОФА заметно снижает возможность взаимодействия хроматина с 3Н-ДОФА. Галоперидол, введенный крысам за 30 мин до инъекции 3Н-ДОФА, вызвал резкое понижение способности 3Н-ДОФА взаимодействовать с ядерными структурами клеток мозга. Присутствие экзогенного ДОФА в организме крысы повышает его способность акцептировать 3Н-лейцин субклеточными структурами.

Использование L-ДОФА в качестве лечебного средства при недостаточности катехоламинной системы головного мозга осуществляется на фоне неясной картины его вмешательства в клеточный метаболизм. В настоящей работе исследовали возможность взаимодействия экзогенного ДОФА с клеточными элементами мозга и печени крыс. Установлено, что 3Н-ДОФА, введенный внутрибрюшинно, прочно соединяется с белками хроматина, причем более интенсивное взаимодействие имеет место в ткани мозга.

## Материалы и методы

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 200 г под эфирной анестезией. После перфузии охлажденным физиологическим раствором готовили гомогенат мозга в 1,9 М сахарозе. Для выделения клеточных ядер гомогенат разбавляли дистиллированной водой до концентрации сахарозы 0,32 М и трижды центрифугировали при 800 г. 15 мин (первое центрифугирование проводили с добавлением тритона X-100). Полученный осадок неочищенных ядер ресуспендировали в 1,6 М сахарозе, центрифугировали 20 мин при 3000 г, надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок очищенных ядер отмывали 0,32 М раствором сахарозы.

Перфузированную печень (10 г) измельчали в 100 мл раствора следующего состава: 0,25 М сахарозы, 0,01 М  $MgCl_2$ , 0,02 М трис-HCl, pH 7,8 и гомогенизировали. Выделение ядер клеток проводили по методу Goldfine, Smith [1], их качество контролировали фазово-контрастной микроскопией и определяли содержание белка, РНК и ДНК [2, 3].

Хроматин выделяли по методу Huang C. C., Huang P. C. [4]. Негистоновые белки хроматина получали суспендированием свежевыделенного хроматина в ра-

створе, содержащем 2 М NaCl, 0,0007 М  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  и 0,0007 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0 и перемешивали на холоду 18 ч, затем добавляли 4 объема 0,015 М боратного буфера, pH 9,0 и перемешивали еще 2 ч. После центрифугирования при 1000 г в течение 15 мин в супернатанте содержались негистоновые белки, а в осадке—комплекс ДНК и гистонов. Супернатант концентрировали высушиванием на холоду.

Гель-фильтрацию негистоновых белков проводили, используя рекомендации Burdman, Hagleid [5]. На колонку размером 1×75 см с сефадексом G-200 помещали негистоновые белки, сконцентрированные лиофильно и растворенные в 1,5 мл 0,0007 М фосфатного буфера, pH 7,0. Колонку уравнивали раствором следующего состава: 0,3 М NaCl, 0,001 М  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,001 М фосфат натрия, pH 7,0—7,5. Белки элюировали со скоростью 6 мл/ч, объем каждой фракции—1,5 мл. Во всех фракциях определяли содержание белка и величину радиоактивности, для чего 0,1 мл наносили на миллипоровый фильтр и подсчитывали на счетчике «Pieretechnik SL» (Франция).

При определении взаимодействия клеточных ядер мозга и печени с  $^3\text{H}$ -ДОФА их суспендировали в 0,32 М сахарозе (мозг), pH 6,5 или в трис-HCl буфере, pH 7,85 (печень) и добавляли 1 мкКи/мл  $^3\text{H}$ -ДОФА с удельной радиоактивностью 3,2 Ки/мм. Смесь инкубировали при 24° 30 мин, наносили на миллипоровые фильтры диаметром пор 0,4 мкм, промывали 20-ю объемами того же буфера и 20-ю объемами 96°-ного спирта. Высушенные фильтры анализировали, как описано выше.

При исследовании взаимодействия хроматина клеток мозга и печени с  $^3\text{H}$ -ДОФА хроматин разводили в растворе, содержащем 0,002 М ЭДТА, 0,05 М трис-HCl, 0,0001 М  $\beta$ -меркаптоэтанол, 5%-ный глицерин, 0,01  $\text{MgCl}_2$ , pH 7,6,  $^3\text{H}$ -ДОФА в концентрации 2 мкКи/мл и инкубировали при 24° 20 мин. Субклеточное фракционирование ткани мозга и печени осуществляли по De Duve и соавт. [6]. Во всех фракциях определяли содержание белка и величину радиоактивности.

### Результаты и обсуждение

При внутрибрюшинном введении крысам  $^3\text{H}$ -ДОФА и последующем выделении клеточных ядер мозга и печени было обнаружено, что  $^3\text{H}$ -ДОФА проникает в клеточные ядра, причем в ядра клеток мозга примерно в 4 раза интенсивнее (табл. 1). Для выяснения того, насколько проникновение специфично, крысам предварительно вводили нерадиоактивный ДОФА в концентрации 20 мг/кг массы, а через 20—30 мин—меченый моноамин, что снижало включение  $^3\text{H}$ -ДОФА в ядра клеток мозга в 6 раз, а печени—более чем в 4 раза.

Результаты экспериментов *in vitro* (табл. 1) показали, что ядра клеток мозга значительно более активны в отношении  $^3\text{H}$ -ДОФА, чем печени, а предварительное насыщение ядер нерадиоактивным препаратом ДОФА снижает включение  $^3\text{H}$ -ДОФА в ядра клеток мозга более чем в 2, а печени—1,5 раза.

С целью изучения распределения  $^3\text{H}$ -ДОФА по клеточным фракциям при внутрибрюшинном введении препарата проводили субклеточное фракционирование тканевого гомогената мозга и печени. При сравнении величин удельной радиоактивности клеточных фракций мозга и печени оказалось, что наибольшее количество метки сосредоточено в ядерной и митохондриальной фракциях, причем в мозгу метка преобладает в клеточных ядрах, а в печени—в лизосомной и митохондриальной фракциях (табл. 2). Вопрос о том, поступает ли ДОФА в клетки мозга через специфические рецепторные пути или минуя их

путем неспецифической диффузии, мы попытались решить, используя ингибитор дофаминовых рецепторов—галоперидол. Внутривнутрибрюшинное введение крысам галоперидола в концентрации 0,1 мг/кг массы резко снижало акцепцию тканью мозга  $^3\text{H}$ -ДОФА, введенного через 30 мин. Субклеточное фракционирование показало, что количество метки в ядрах клеток мозга уменьшалось примерно в 2 раза, а в митохондриальной и лизосомной фракциях практически не изменялось. В ядерной

Таблица 1

Включение  $^3\text{H}$ -ДОФА в ядра клеток мозга и печени *in vivo* и *in vitro* (имп/мин/мг белка)

|        | <i>In vivo</i>                              |                                                                                | <i>In vitro</i>                                       |                                                                                   |
|--------|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
|        | Внутрибрюшинное введение $^3\text{H}$ -ДОФА | Предварительное внутрибрюшинное введение ДОФА: через 30 мин $^3\text{H}$ -ДОФА | Взаимодействие $^3\text{H}$ -ДОФА с клеточными ядрами | Предварительная инкубация ядер с ДОФА: добавление через 30 мин $^3\text{H}$ -ДОФА |
| Мозг   | $1,25 \cdot 10^4 \pm 6,2 \cdot 10^2$        | $2,2 \cdot 10^3 \pm 1,03 \cdot 10^2$                                           | $2,3 \cdot 10^6 \pm 10^5$                             | $9,4 \cdot 10^5 \pm 3,8 \cdot 10^4$                                               |
| Печень | $3,2 \cdot 10^3 \pm 1,3 \cdot 10^2$<br>n=7  | $7,0 \cdot 10^2 \pm 31$<br>n=9                                                 | $2,3 \cdot 10^5 \pm 8,9 \cdot 10^3$<br>n=8            | $1,5 \cdot 10^5 \pm 7,0 \cdot 10^2$<br>n=8                                        |

Примечание.  $p < 0,01$  во всех вариантах опытов.

фракции, насыщенной галоперидолом, а затем  $^3\text{H}$ -ДОФА, влияние галоперидола не выявлялось: интенсивность радиоактивности ядер была на уровне контроля (табл. 3). На основании этих опытов можно предположить, что ДОФА проникает в клетку через дофаминовые рецепторы. Отсутствие полного ингибирования на фоне предварительного введения галоперидола можно расценить как наличие альтернативного механизма проникновения нейромедиатора в клетку.

Таблица 2

Включение  $^3\text{H}$ -ДОФА в различные фракции головного мозга и печени крыс при внутрибрюшинном введении (имп/мин/мг белка)

| Ткань        | Общий гомогенат | Ядерная фракция | Митохондриальная фракция | Лизосомная фракция |
|--------------|-----------------|-----------------|--------------------------|--------------------|
| Мозг (n=7)   | $430 \pm 48$    | $759 \pm 60$    | $300 \pm 27$             | $382 \pm 41$       |
| Печень (n=7) | $380 \pm 40$    | $155 \pm 20$    | $285 \pm 37$             | $620 \pm 72$       |
|              | $p > 0,01$      | $p < 0,01$      | $p > 0,01$               | $p < 0,01$         |

Для определения дальнейших путей внутриклеточного действия  $^3\text{H}$ -ДОФА из ядер мозга и печени после их взаимодействия с  $^3\text{H}$ -ДОФА выделяли хроматин, который диссоциировали на негистоновые белки и ДНК-гистоновый комплекс. При подсчете радиоактивности оказалось, что основное количество метки приходится на негистоновые белки, а на долю ДНК-гистонового комплекса—лишь 15% радиоактивности.

Гель-фильтрация негистоновых белков мозга, связавшихся с  $^3\text{H}$ -

ДОФА через сефадекс G-200, выявила, что основное количество метки принадлежало белку с величиной  $M_r$  200 кД (рис. 1, а). Изучение распределения  $^3\text{H}$ -ДОФА, связавшегося с белками печени, показало присутствие радиоактивного амина в комплексе с белками с величиной  $M_r$  25 кД (рис. 1, б). Из рис. 1 видно, что интенсивность взаимодействия  $^3\text{H}$ -ДОФА с белками хроматина мозга выражена значительно сильнее, чем с белками хроматина печени.

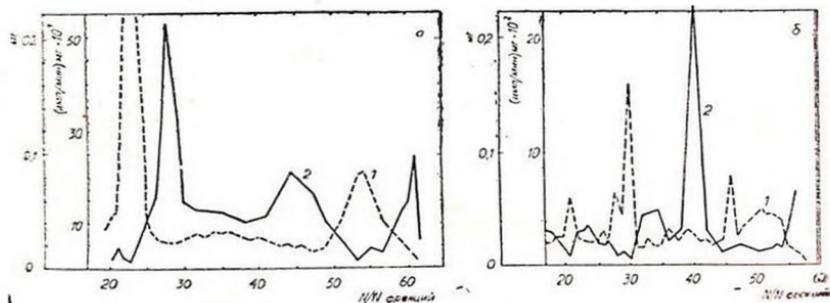


Рис. 1. Гель-фильтрация через сефадекс G-200 негистоновых белков хроматина клеток мозга (а) и печени (б). 1—белок  $A_{280}$ , 2—белок с  $^3\text{H}$ -ДОФА. По оси абсцисс—номера фракций, по оси ординат—содержание белка (в мг) связывания  $^3\text{H}$ -ДОФА (в имп/мин/мг белка)

Мы попытались определить функциональное значение взаимодействия моноамина с хроматином на модели с использованием радиоактивной аминокислоты.  $^3\text{H}$ -лейцин вводили крысам на фоне предварительного введения ДОФА в концентрации 10, 20, 40 и 80 мг/кг массы тела. Препараты вводили внутривентрикулярно с интервалом в 30 мин.

Таблица 3

Включение  $^3\text{H}$ -ДОФА в различные фракции головного мозга крыс на фоне предварительного внутривентрикулярного введения галоперидола (имп/мин/мг белка)

|                | Общий гомогенат           | Ядерная фракция           | Митохондриальная фракция | Лизосомная фракция        |
|----------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Опыт (n=9)     | $7,6 \cdot 10^3 \pm 80$   | $8,8 \cdot 10^3 \pm 60$   | $5 \cdot 10^3 \pm 90$    | $1,43 \cdot 10^4 \pm 160$ |
| Контроль (n=8) | $2,04 \cdot 10^4 \pm 150$ | $1,98 \cdot 10^4 \pm 140$ | $4,4 \cdot 10^3 \pm 70$  | $1,74 \cdot 10^4 \pm 180$ |
|                | $p < 0,01$                | $p < 0,01$                | $p > 0,01$               | $p > 0,01$                |

Лейцин применяли в дозе 0,1 мКи/100 г массы тела. Затем из мозга и печени выделяли субклеточные фракции, в которых измеряли уровень радиоактивности. Результаты этих опытов представлены на рис. 2, из которого видно, что в присутствии ДОФА включение  $^3\text{H}$ -лейцина заметно нарастает во всех внутриклеточных фракциях мозговой ткани, оставляя без изменения уровень радиоактивности внутриклеточных фракций печени.

При сравнении действия различных использованных нами доз ДОФА оказалось, что доза 20 мг/кг массы обладает наиболее выраженным биологическим эффектом. Повышение дозы до 80 мг/кг приводило к противоположному действию: введение ДОФА в такой концентрации способствовало ингибированию белкового синтеза в мозгу.

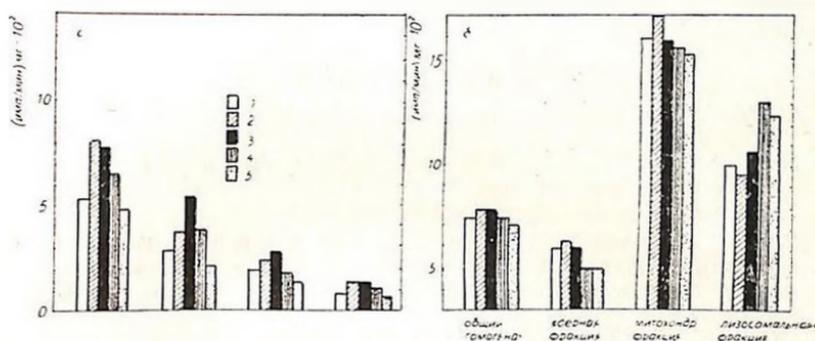


Рис. 2. Включение <sup>3</sup>H-лейцина в различные фракции головного мозга (а) и печени (б) крыс на фоне предварительного введения ДОФА: 1—контроль, 2—10 мг/кг, 3—20 мг/кг, 4—10 мг/кг, 5—80 мг/кг

Показано, что нейромедиаторы способствуют повышению синтеза сАМР или сГМР [7, 8]. Известно также, что нейромедиаторы могут взаимодействовать и с внутриклеточными структурами [9, 10]. В настоящей работе сделана попытка выяснить возможный молекулярный механизм влияния L-ДОФА на биосинтез белка.

На основании изложенного можно прийти к заключению, что взаимодействие с ДОФА является специфичным для ткани мозга. Использование ингибитора дофаминовых рецепторов—галоперидола резко снижало акцепторную способность ядер мозга по отношению к <sup>3</sup>H-ДОФА. Результаты наших опытов позволяют сделать вывод, что поступление ДОФА в клетки может происходить двумя способами: специфическим, через рецептор, и путем неспецифической диффузии.

В клетке ДОФА взаимодействует с белками хроматина и в определенных дозах оказывает влияние на способность клеток акцептировать аминокислоты. Специфичность влияния ДОФА на ткань мозга может интерпретироваться как свидетельство тканеспецифичного пути активации генома и последующей перестройки пластических процессов.

## INTERACTION BETWEEN L-DOPA AND INTRACELLULAR STRUCTURES IN RAT BRAIN AND LIVER

ТРЕТЯК Т. М., АРХИПОВА Л. В.

Institute of Biological Physics, Poustchino

It was found that L-DOPA, a dopamine precursor, when injected intraperitoneally could penetrate into brain and liver cells and interact

there with nonhistone proteins of chromatin. Preliminary injection of nonradioactive L-DOPA to experimental rats decreases the intensity of the interaction of chromatin with  $^3\text{H}$ -DOPA. Pretreatment with haloperidol blocking dopamine receptors drastically diminishes the interaction of L-DOPA with brain cells nuclear structures. DOPA substantially increases  $^3\text{H}$ -leucine incorporation into all subcellular brain fractions studied.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Goldfine I. D., Smith G. J. Proc. Nat. Acad. Sci., USA., v. 73, № 5, p. 1427—1431, 1976.
2. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 423—434, 1951.
3. Спириш А. С. Биохимия, т. 23, № 5, с. 659—660, 1958.
4. Huang C. C., Huang P. C. J. Neurochem., v. 29 № 1, p. 5—12, 1969.
5. Burdman J. A., Hagleid K. J. Neurochem., v. 17, № 5, p. 669—674, 1970.
6. De Duve C., Pressman B. C., Gionetto R., Wattiaux R., Appelans F. J. Biochem., v. 60, № 4, p. 604—617, 1955.
7. Phillipson O. T., Horn A. S. Nature, v. 261, № 5559, p. 418—420, 1976.
8. Cohn M. L., Cohn M. L., Taylor F. H. Science, v. 199, № 4326, p. 319—321, 1978.
9. Roel L. E., Schwartz S. A., Weiss B. E., Munro H. N., Wurtman R. J. J. Neurochem., v. 23, p. 223—239, 1974.
10. Hogenauer C., Krell G., Bernheimer H. FEBS Lett., v. 88, № 1, p. 101—163, 1978.

Поступила 12. VII 1985