

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕПТИДА ДЕЛЬТА-СНА ПРИ СТРЕССОРНЫХ СОСТОЯНИЯХ ОРГАНИЗМА

ХВАТОВА Е. М., *ДОВЕДОВА Е. Л., **МИХАЛЕВА И. И.

Горьковский медицинский институт, *НИИ мозга ВНИЦ психического
здоровья АМН СССР

**Институт биорганической химии АН СССР, Москва

Исследовано влияние пептида дельта-сна (ПДС) в стрессорных состояниях организма на содержание серотонина и 5-оксиндоуксусной кислоты (5'-ОИУК) мозга, и активность ферментов наружной мембраны митохондрий: MAO типа А, MAO типа Б и гексокиназы. Уровень серотонина во всех изученных состояниях не отличается от нормы, содержание 5'-ОИУК увеличено, особенно в хвостатом ядре и коре мозга кроликов. Установлена значительная активация MAO типа А в отдельных образованиях и в целом мозгу животных; напротив, активность MAO типа Б подавляется. Введение ПДС регулирует распределение MAO типа А между митохондриями и цитоплазмой, изменяющееся при стрессовом состоянии и полностью предупреждает стресс-протективную мобилизацию гексокиназы, восстанавливая до нормы способность фермента к адсорбции на митохондриальной мембране.

Показано, что нонапептид, получивший название пептида дельта-сна (ПДС), оказывает широкое влияние на различные типы функциональных реакций организма [1], в частности обладает антистрессорным влиянием [2, 3]. Однако до сих пор неизвестен специфический механизм действия ПДС и невелика информация о метаболическом ответе головного мозга на его введение.

В настоящем сообщении представлены данные о влиянии введения ПДС при стрессорных состояниях организма на активность в ткани мозга митохондриальной MAO типа А и Б, а также на активность фермента с переменной внутриклеточной локализацией—гексокиназы (ГК), на содержание серотонина и 5'-ОИУК в субклеточных фракциях гомогената мозга.

Материалы и методы

Эксперименты были проведены на кроликах и беспородных крысах-самцах. Стрессорное состояние с целью создания психомоторного возбуждения вызывали введением L-ДОФА (диэтилэрипринино, 50—60 мг/кг) или пребыванием животных в барокамере (196 мм рт. ст., экспозиция 15 мин) с целью создания острой реакции в ответ на быстрое разрежение атмосферы. Через 60 мин после введения психомоторного агента кроликам субокупиально производили инъекцию ПДС в дозе 50 мг/кг и прослеживали его действие 30 мин. Крысам ПДС вводили внутрибрюшинно за 20 мин до помещения в барокамеру. Из сенсомоторной области коры больших полушарий и хвостатого ядра мозга кроликов и из больших полушарий мозга крыс методом дифференциального центрифугирования выделяли неочищенную митохондриальную и цитоплазматическую фракции [4]. При последующем высокоскоростном центрифугировании в ступенчатом градиенте плотности сахарозы митохондриальную фракцию разделяли на суммарные фракции синапсом и митохондрий [5].

Активность MAO типа А (субстрат серотонин) и MAO типа Б (субстрат p-нитро-фенилэтиламин) у кроликов определяли спектрофотометрически при 240 и 450 нм со-

ответственно, регистрируя образующиеся в присутствии семикарбазида продукты окислительного дезаминирования используемых NH_2 -субстратов [6]. Активность MAO типа А у крыс определяли по методу Горкина и соавт. [7]; об активности фермента судили по освобождению аммиака после изотермической стгонки. Содержание серотонина и 5'-ОИУК в субфракциях синапсом определяли флуорометрическим методом [8]. Активность ГК определяли в очищенной фракции митохондрий мозга крыс энзиматическим методом и выражали в нмоль NADPH/мин/г ткани [9]. Способность ГК к сольбулизации с митохондриальной мембраной определяли при ступенчатой 3-кратной добавке 0,1 М KCl [10, 11]. Связывание ее с мембраной митохондрий изучали при добавлении в среду инкубации 10 мМ MgCl_2 [12].

Результаты и обсуждение

При введении ПДС интактным животным активность молекулярных форм MAO в мозгу кроликов и крыс изменялась разнонаправленно (рис. 1). Активность MAO типа А в митохондриях, выделенных из целого мозга крыс, так же, как в митохондриях сенсомоторной коры и хвостатого ядра мозга кроликов, возрастала, тогда как активность MAO типа В, напротив, в них подавлялась. То же самое устойчиво проявлялось и в синапсоммах.

Введение психостимулирующего агента (L-ДОФА) кроликам, при-

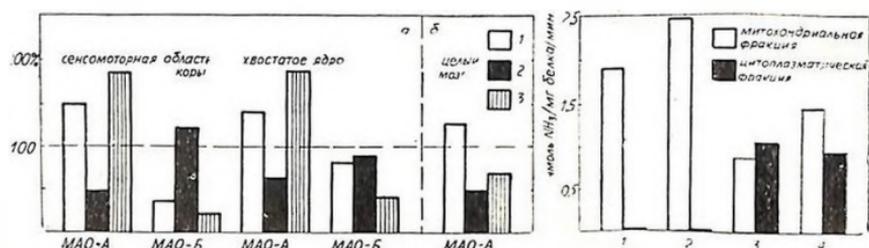


Рис. 1. Влияние ПДС на активность MAO митохондрий мозга кроликов (а) и крыс (б) в норме и стрессорном состоянии животных. 1—ПДС. 2—стрессорное состояние, 3—ПДС+стрессорное состояние. По оси ординат—активность MAO в %

Рис. 2. Активность MAO типа А в митохондриальной и цитоплазматической фракции мозга крыс в норме (1), при гипоксическом стрессе (2), введении ПДС (3) и сочетании действия гипоксического стресса и введения ПДС (4). По оси ординат—активность MAO типа А (нмоль NH_3 /мг белка/мин)

водившее их в состояние моторного возбуждения или пребывание крыс в разреженной атмосфере, сопровождались одинаковым изменением активности молекулярной системы MAO. Двукратное снижение активности MAO типа А найдено у крыс и кроликов как в митохондриях из целого мозга, так и в субклеточных фракциях отдельных структур мозга (рис. 1). В отличие от этого, активность MAO типа В в субклеточных фракциях обеих структур существенно не отклонялась от нормы, за исключением

лишь активации МАО типа Б в синапсосамах сенсомоторной коры кроликов.

В другой серии опытов было изучено влияние ПДС до и после воздействия стрессорного агента. Введение ПДС крысам до помещения их в барокамеру приводило к частичному снижению эффекта этого фактора на активность МАО типа А в митохондриях мозга крыс. Введение ПДС кроликам, получившим L-ДОФА, приводило к значительной активации (в 2 раза выше нормы) МАО типа А, что было в равной степени выражено в митохондриях своих исследованных образований мозга (рис. 1). Активность МАО типа Б в этом случае также значительно изменялась — ее уменьшение составляло от 3 до 7 раз в субфракциях ткани мозга и было особенно выражено в коре.

Изучение активности МАО типа А в митохондриальной и цитоплазматической фракциях мозга крыс показало (рис. 2), что в норме в цитоплазме активность МАО типа А достоверно не выявлялась. После введения ПДС происходило увеличение моноаминоксидазной активности, но лишь в митохондриальной фракции. При стрессорной же гипоксии были установлены существенные изменения. В этих условиях происходило снижение активности МАО типа А в митохондриях, и она появлялась в цитоплазме, причем ее величина в последней становилась практически равной с активностью в митохондриальной фракции. Предварительное введение ПДС животным до их помещения в барокамеру приводило к значительно меньшему падению активности МАО типа А в митохондриях и лишь небольшому повышению ее в цитоплазме. Однако в обеих субфракциях величина активности МАО типа А не достигала все же исходного уровня у интактных животных (рис. 2).

Уровень содержания серотонина в субфракциях клеток мозга во всех изученных состояниях практически не отличался от нормы. Установлено лишь нарастание количества его метаболита (5'-ОИУК), наиболее выраженное в синапсосамах хвостатого ядра мозга кроликов при введении ПДС.

Далее в тех же условиях была изучена активность ГК как ключевого фермента утилизации глюкозы в мозгу с характерной особенностью этого фермента — переменной внутриклеточной локализацией при экранировании в митохондриях их наружной мембраной. Как видно из таблицы, у интактных животных 90% общей клеточной активности ГК связано с митохондриями. При стрессорном состоянии организма доля митохондриальной ГК снижалась на 10%, введение же ПДС препятствовало этому эффекту стресса. Существенных изменений в гексокиназной активности цитоплазмы не было установлено.

Способность ГК к солиобилизации заметно меняется под действием 0,1 М КСl. Так, при 3-кратном повторении добавки 0,1 М КСl к митохондриям интактных животных первая порция снимала 25% активности ГК, а последняя оставляла на митохондриальной мембране лишь 51% от исходной величины. При стрессорном воздействии 1-я солиобилизация снимала 41,5% активности ГК, а после 3-й оставалось всего

Таблица

Внутриклеточное распределение активности гексокиназы и способность фермента к солюбилизации с митохондриальными мембран в норме, при гипоксическом стрессе и введении пептида дельта-сна (ПДС)

Активность гексокиназы и мкмоль NADPH /миг ткани					
Норма		Гипоксический стресс		Сочетание стресса и ПДС	
клеточная	митохондриальная	клеточная	митохондриальная	клеточная	митохондриальная
Общая	исходная	общая	исходная	общая	исходная
12,60±0,24	10,20±0,19	14,90±0,11	12,03±0,20	12,68±0,14	11,67±0,18
Митохондриальная	1-е добавление КС1	митохондриальная	1-е добавление КС1	митохондриальная	1-е добавление КС1
11,2±0,2	7,6±0,4	12,03±0,14	7,03±0,20	11,67±0,18	10,0±0,19
Цитоплазматическая	2-е добавление КС1	цитоплазматическая	2-е добавление КС1	цитоплазматическая	2-е добавление КС1
0,58±0,01	6,50±0,38	0,78±0,02	6,3±0,2	0,69±0,01	8,90±0,13
	3-е добавление КС1		3-е добавление КС1		3-е добавление КС1
	5,2±0,2		5,50±0,18		6,5±0,1

46% активности ГК, связанной с митохондриями. Предварительное введение ПДС предупреждало нарушение мембранно-ферментных взаимоотношений и после 1-й солюбилизации потеря активности ГК митохондрией составляла лишь 14,5%, а после 3-й в них оставалось еще более 55% активности (таблица).

Полученные данные свидетельствуют, что солюбилизация ГК с митохондриальной мембраны наиболее эффективна при первой добавке 0,1 М КСl; лабильность связи этой части ГК в митохондриях подтверждается увеличением выхода ГК при этом почти в 2 раза в сравнении с нормой у животных, находившихся в стрессорном состоянии.

Изменение степени солюбилизации ГК в присутствии КСl отчетливо указывает на нарушение связи этого фермента с наружной мембраной митохондрий в условиях острого гипоксического стресса и предупреждения этого нарушения введением ПДС. В пользу этого свидетельствуют также результаты исследования способности ГК к адсорбции митохондриями при добавлении в среду инкубации $MgCl_2$. В норме митохондрии способны адсорбировать 40% ГК из инкубационной среды, при стрессорном состоянии только 14%, а после введения ПДС эта способность сохранялась почти на уровне нормы, оставляя 37,5%.

Проведенные исследования по изучению влияния ПДС на ферментативную активность в мозгу позволили установить, что он оказывает влияние на активность ферментов, ассоциированных с наружной мембраной митохондрий. Введение ПДС изменяло активность MAO в митохондриях мозга в зависимости от типа этого фермента: активность MAO типа А возрастала во всех изученных отделах мозга, в то время как активность MAO типа Б заметно снижалась в коре больших полушарий и несколько меньше—в хвостатом ядре. Еще большие различия были выявлены при введении ПДС в качестве антистрессорного средства. Так, ПДС в 2—4 раза увеличивал активность MAO типа А, сниженную в митохондриях мозга в условиях действия стресса, тогда как активность MAO типа Б в этом случае, напротив, еще больше подавлялась. В норме введение ПДС не изменяло внутриклеточное распределение моноаминоксидазной активности, практически сосредоточенной в митохондриальной фракции. При стрессорном же состоянии, наряду со снижением активности MAO в митохондриях, была установлена значительная ее активность в цитоплазме, а введение ПДС, хотя и не полностью, предохраняло от этих сдвигов.

Еще более наглядны изменения в активности ГК, характеризующейся переменной внутриклеточной локализацией. Введение ПДС при стрессорном состоянии полностью предотвращало выход ГК из митохондрий. Это было убедительно подтверждено и при изучении солюбилизации ГК под влиянием КСl. В этом случае введение ПДС не только полностью предупреждало вызываемое стрессом увеличение солюбилизации фермента, но даже проявлялось определенное удержание ГК митохондриями. Одновременно при введении ПДС способность митохондриальной мембра-

лы к адсорбции ГК сохранялась на уровне нормы, тогда как в отсутствие ПДС при стрессе она уменьшалась в 3 раза.

Таким образом, на двух моделях стрессорного состояния животных установлено влияние ПДС на активность и внутриклеточное распределение ферментов (МАО и ГК), ассоциированных с наружной мембраной митохондрий. В то же время с помощью радиоиммунного анализа выяснено, что ПДС-подсбный материал содержится внутриклеточно, главным образом, в митохондриях, и показано проникновение ПДС через ГЭБ [13]. Эти данные могут свидетельствовать о прямом влиянии экзогенного ПДС на митохондрию ткани головного мозга, а также о мембранном эффекте ПДС, наиболее отчетливо проявляющемся при стрессорном состоянии организма. Выявленные нами различия в конечном результате действия ПДС на молекулярные формы МАО логично связать с разной прочностью их связи с митохондриальной мембраной. По мнению Горошинской [14], МАО типа Б имеет более устойчивую связь с митохондриями, чем МАО типа А. Значительная активация МАО типа А при введении ПДС в стрессорном состоянии, наиболее выраженная в субфракциях коры больших полушарий мозга, позволяет думать, что ПДС может оказывать стресс-протективное и антиневротическое действие в условиях психомоторного стресса.

Было также показано, что ПДС, наряду с известными метаболитами [15], может участвовать во внутриклеточном перераспределении ГК как фактор регуляции ее активности.

METABOLIC EFFECTS OF DELTA SLEEP INDUCING PEPTIDE IN STRESS

KHVATOVA E. M., *DOVEDOVA E. L., **MIKHALEVA I. I.

Gorky Medical School, *Brain Research Institute, All-Union Research Center of Mental Health, USSR Acad. Med. Sci. Moscow; **M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry, USSR Acad. Sci, Moscow.

In stress conditions the effect of delta sleep inducing peptide has been studied on the activity of brain MaO (both types) and hexokinase as well as on the content of serotonin and 5-hydroxyindolic acid in brain subcellular fractions. The serotonin level at all states studied does not differ from the control, the amount of 5-OIAA is increased, particularly in nucleus caudatus and brain cortex. The significant activation of MAO-A in some brain structures and in the whole brain is found; on the contrary the MAO-B activity is decreased. The DSIP infusion regulates the distribution of MAO-A between the mitochondria and cytoplasm, that changes in stress, and completely preserves stress-protective solubilization of hexokinase normalizing the ability of the enzyme to absorb on mitochondrial membranes.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Kastin A. Y., Olson S. A., Shally A. V., Coy D. H.* Trends Neurosci., v. 3, p. 163—165, 1980.
2. *Scherschlicht R., Marias J., Schneeberger J., Steiner M.* — In: Sleep (eds. W. P. Koella, P. Levin), p. 147—155, Basel, S. Karger A. G., 1981.
3. *Судаков К. В., Иванов В. П., Коплик Е. В., Михалева И. И.* Физiol. журн, СССР, т. 18, с. 1—5, 1983.
4. *Бизольд Д.*—В кн.: Биохимия и функция нервной системы. Материалы международного симпозиума, с. 115—122, Л., Наука, 1965.
5. *De Robertis E., Pellegrino de rald P. A., Rodrigues de Leres Arnais R., Salganicoff L.* J. Neurochem., v. 9, p. 23—25, 1962.
6. *Porov N., Rösler V., Thiemann C., Mathies H.* Acta biol. et med. germ., B. 26, S 239—245, 1971.
7. *Горкин В. Э., Веревкина А. В., Гринцева Л. И.*—В кн.: Современные методы в биохимии, т. 2, с. 155—157, М., Медицина, 1968.
8. *Koian B. M., Нечасов Н. В.* Лаб. дело, т. 5, с. 301—303, 1979.
9. *Purich D., From H. et al.* Adv. Enzymol., v. 39, p. 249—326, 1973.
10. *Wilson J. E. J.* Biol. Chem., v. 243, № 13, p. 3640—3647, 1968.
11. *Алексахина Н. В., Ситнина Н. Ю., Щербатых Л. Н.* Биохимия, т. 38, № 38, с. 915—921, 1975.
12. *Erik D. S. et al.* Biochim. et biophys. acta, v. 755, p. 112—118, 1983.
13. *Graf M., Kastin A.* Neurosci. a. Biobehav. reviews, v. 8, p. 83—93, 1984.
14. *Горошинская И. А.* Укр. биохим. журн., т. 57, № 2, с. 41—46, 1985.
15. *Wilson J. E.* Curr. topics in Cell Regul., v. 16, p. 2—54, 1980.

Поступила 9. IX 1986.

УДК 612.766.2—08:612.822.1:[547.95:547.943]

РЕАКЦИЯ ОПИОИДНОЙ СИСТЕМЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА НА СТРЕСС И ЕЕ ЗАВИСИМОСТЬ ОТ СОСТОЯНИЯ КАТЕХОЛАМИНЕРГИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

ТИГРАНЯН Р. А.

Институт по стандартизации и контролю лекарственных средств МЗ СССР, Москва

В различных отделах головного мозга крыс (гипоталамус, средний и продолговатый мозг, гипофиз, стриатум) исследовали содержание β -эндорфина, Met-, Leu-энкефалина при воздействии однократной и многократно повторяемой иммобилизации. Показано, что ответная реакция опийных систем на иммобилизационный стресс особенно выражена в эмоциогенных структурах мозга (гипоталамус и средний мозг) и гипофизе. Содержание опиоидных пептидов менялось в зависимости от длительности иммобилизации; наиболее выраженные изменения отмечались на 150-й мин. После ежедневной в течение 40 дней иммобилизации наблюдалось развитие адаптации к этому хроническому стрессорному воздействию. Внутривентрикулярное введение α -оксидамина (6-ОН-ДА) вызывало повышение концентрации опиоидов в большинстве структур мозга. Внутривентрикулярная инъекция 6-ОН-ДА не оказывала выраженного влияния на содержание опиоидных пептидов в исследованных тканях, но изменяла направленность ответа опийной системы при иммобилизационном стрессе.