

Статті

УДК 612.82.015:612.432/.434]:616.453-008.64

Л.М.Калинська, В.Я.Кононенко

Активність енкефалінергічної системи мозку
та гіпофіза за умов експериментального гіпокортицизму

На экспериментальных моделях гипокортицизма проанализированы изменения основных нейрохимических параметров энкефалинергической системы — содержания лей-энкефалина, активности энкефалингидролизующих ферментов (энкефалиназы А и В, энкефалинаминопептидазы), а также специфического связывания ^3H -лей-энкефалина с опиоидными рецепторами в переднем и медио-базальном гипоталамусе, стриатуме, продолговатом мозге и аденогипофизе крыс. Показано, что после односторонней адреналэктомии содержание лей-энкефалина в мозге и гипофизе не изменяется. После двусторонней адреналэктомии изменения уровня нейрорепептида носят двуфазный характер: снижение содержания лей-энкефалина в гипоталамусе, стриатуме и аденогипофизе на 7-е сутки и повышение его содержания до нормального уровня на 10-е сутки после операции. Снижение содержания лей-энкефалина в мозге крыс на 7-е сутки после адреналэктомии происходит одновременно со снижением активности энкефалинаминопептидазы и снижением специфического связывания меченого лей-энкефалина, что свидетельствует об усилении высвобождения энкефалина из нейросекреторных гранул структур мозга после адреналэктомии. При введении гидрокортизона и аденокортикотропного гормона (АКТГ) адреналэктомизированным животным выявлены существенные различия характера изменений содержания, рецепции и инактивации лей-энкефалина на уровне аденогипофиза и гипоталамуса, стриатума и продолговатого мозга.

Вступ

Регуляція нейропептидами численних функцій в організмі в нормі і патології здійснюється за рахунок взаємодій з іншими біологічно активними речовинами, зокрема з гормонами, механізми яких недостатньо досліджені й уявляються досить складними. Вивчення механізмів регуляції активності енкефалінергічних опіоїдних систем гормонами гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової системи (ГГНС) має важливе теоретичне, а також практичне значення при аналізі патогенезу гіпер- і гіпокортикальних станів. Метою нашої роботи було вивчення активності основних компонентів енкефалінергічної системи мозку і гіпофіза за умов експериментального гіпокортицизму та введення адреналектомованим тваринам гормонів ГГНС.

Методика

Досліди провадили на щурах-самцях лінії Вістар масою 170—200 г. Першу групу тварин (контрольну) складали несправжньооперовані щури, другу та третю — щури з експериментальним гіпокортицизмом, який викликали двобічною та однібічною відповідно адреналектомією, четверту і п'яту —

адреналектомовані тварини, яким за 4 год до декапітації внутрішньом'язово вводили гідрокортизон-ацетат фірми «Геден Ріхтер» (Угорщина) у дозі 50 мг/кг та АКТГ (Каунаського заводу ендокринних препаратів) в дозі 25 Мод/кг. Тварин брали в дослід через 7 діб та через 10 діб після адреналектомії. Адреналектомованим тваринам замість води давали 0,9 %-вий розчин NaCl.

Із мозку видаляли передню та медіобазальну частину гіпоталамуса, стріатум, довгастий мозок. Досліджували також аденогіпофіз. Вміст лейцин-енкефаліну визначали методом радіоімунного аналізу за допомогою наборів фірми «Incstar» (США) після екстракції опіоїдних пептидів із тканини мозку 0,1 моль/л розчином оцтової кислоти [5]. Величину специфічного зв'язування ^3H -лейцин-енкефаліну (1,81 ТБк/ммоль, фірми «Amersham», Англія) з опіоїдними рецепторами у препаратах синаптичних мембран мозку [7] визначали як різницю зв'язування мітки у відсутності (дослідна проба) й присутності (контрольна проба) в реакційній суміші неміченого ліганду. Інкубаційна суміш складалася з ^3H -лейцин-енкефаліну у концентрації 10 нмоль/л, стабільного лей-енкефаліну в концентрації 2 мкмоль/л, як агенту, що витісняє мічений ліганд, бацитраціну (50 мкг/мл), 0,4—0,5 мг білка синаптичних мембран, 50 ммоль/л *tris*-HCl буферу (pH 7,4) в об'ємі 1,0 мл. Після 40 хв інкубації проводили розділення зв'язаного і вільного енкефаліну методом вакуумного фільтрування через фільтри «Sinpor» (Чехія). Величину специфічного зв'язування виражали у фмолях на 1 мг білка. Активність енкефалінгідролізуючих ферментів — енкефалінази А, енкефалінази В і енкефалінамінопептидази, які каталізують розщеплення різних зв'язків у молекулі енкефаліну, визначали у фракції синаптичних мембран за рівнем радіоактивності продуктів ферментативної деградації ^3H -лейцин-енкефаліну (1,81 ТБк/ммоль), фірми «Amersham» (Англія) за допомогою методу тонкошарової хроматографії [10]. Хроматографію здійснювали на пластинках «Silufol 254» (Чехія). Активність енкефалінази А виражали в пмолях тир-глі-глі на мг білка за 1 хв. Активність енкефалінази В — в пмолях тир-глі на мг білка за 1 хв, енкефалінамінопептидази в пмолях тирозину на мг білка за 1 хв. Кількість білка визначали за Лоурі [15]. Одержані результати обробляли методом варіаційної статистики, використовуючи критерій t Стюдента.

Результати та їх обговорення

Через 7 діб після двобічної адреналектомії виявлено зниження вмісту лейцин-енкефаліну в передній і медіо-базальній частинах гіпоталамуса, стріатумі, а також в аденогіпофізі шурів. Після однобічної адреналектомії істотного зниження рівня лейцин-енкефаліну в структурах мозку та гіпофізі не спостерігається (табл. 1). Одночасно зі зниженням рівня лейцин-енкефаліну на 7-му добу після двобічної адреналектомії виявлено зниження специфічного рецепторного зв'язування ^3H -лейцин-енкефаліну в гіпоталамусі й аденогіпофізі, а також в стріатумі та довгастому мозку (табл. 2). При дослідженні енкефалінгідролізуючих ферментів показано зниження активності енкефалінамінопептидази в гіпоталамусі, довгастому мозку та аденогіпофізі адреналектомованих шурів. Активність енкефалінази А та енкефалінази В на 7-му добу після двобічної адреналектомії не змінюється (табл. 3).

Дослідження, проведені на 10-ту добу після адреналектомії свідчать про підвищення вмісту лейцин-енкефаліну в гіпоталамусі, стріатумі та аде-

Таблиця 1. Вміст лейцин-енкефаліну (пмоль/мг тканини) в мозку та гіпофізі щурів через 7 діб після адrenaлектомії ($M \pm m$, $n = 5$)

Об'єкт дослідження	Контроль	Двобічна адrenaлектомія	Однобічна адrenaлектомія
Передній гіпоталамус	1,144 $\pm$ 0,131	0,407 $\pm$ 0,065*	0,916 $\pm$ 0,111
Медіо-базальний гіпоталамус	1,138 $\pm$ 0,201	0,652 $\pm$ 0,028*	0,741 $\pm$ 0,112
Стріатум	0,802 $\pm$ 0,080	0,418 $\pm$ 0,032*	0,750 $\pm$ 0,086
Аденогіпофіз	1,437 $\pm$ 0,186	0,599 $\pm$ 0,169*	1,125 $\pm$ 0,116

У табл. 1—4 * $P < 0,001$ —0,05 порівняно з контролем, ** $P < 0,001$ —0,05 порівняно з адrenaлектомією.

Таблиця 2. Специфічне зв'язування 3H -лейцин-енкефаліну з опіатними рецепторами в мозку і гіпофізі щурів після адrenaлектомії (фмоль/мг білка, $M \pm m$, $n = 6$)

Об'єкт дослідження	Контроль	Двобічна адrenaлектомія (7 діб)	Адrenaлектомія з введенням гідрокортизону	Адrenaлектомія з введенням АКТГ
Гіпоталамус	182,3 $\pm$ 20,7	44,6 $\pm$ 3,2*	316,9 $\pm$ 18,9**	126,6 $\pm$ 10,3**
Стріатум	394,9 $\pm$ 29,3	49,1 $\pm$ 2,8*	418,1 $\pm$ 35,1**	118,5 $\pm$ 9,6**
Довгастий	114,8 $\pm$ 7,3	26,2 $\pm$ 1,7*	47,7 $\pm$ 4,1**	100,6 $\pm$ 9,3**
Аденогіпофіз	1499,9 $\pm$ 53,4	746,0 $\pm$ 47,2*	459,7 $\pm$ 32,8**	341,6 $\pm$ 25,1**

Таблиця 3. Активність енкефалінгідролізуючих ферментів (пмоль/мг білка/хв) в мозку та гіпофізі щурів після адrenaлектомії та введення адrenaлектомованим тваринам гормонів ($M \pm m$, $n = 5$)

Об'єкт дослідження	Контроль	Двобічна адrenaлектомія (7 діб)	Адrenaлектомія з введенням гідрокортизону	Адrenaлектомія з введенням АКТГ
Енкефаліназа А				
Гіпоталамус	1,53 $\pm$ 0,24	1,59 $\pm$ 0,24	1,17 $\pm$ 0,18	1,04 $\pm$ 0,15
Стріатум	1,32 $\pm$ 0,13	1,78 $\pm$ 0,31	1,54 $\pm$ 0,33	1,51 $\pm$ 0,27
Довгастий мозок	1,40 $\pm$ 0,15	1,31 $\pm$ 0,19	0,98 $\pm$ 0,13*	0,96 $\pm$ 0,12*
Аденогіпофіз	2,40 $\pm$ 0,14	2,19 $\pm$ 0,12	3,03 $\pm$ 0,31**	3,41 $\pm$ 0,51**
Енкефаліназа В				
Гіпоталамус	0,68 $\pm$ 0,03	0,62 $\pm$ 0,05	0,48 $\pm$ 0,06*	0,47 $\pm$ 0,02*,**
Стріатум	0,74 $\pm$ 0,10	0,89 $\pm$ 0,15	0,83 $\pm$ 0,12	0,74 $\pm$ 0,14
Довгастий мозок	1,15 $\pm$ 0,13	0,87 $\pm$ 0,12	0,73 $\pm$ 0,10*	0,66 $\pm$ 0,10*
Аденогіпофіз	1,31 $\pm$ 0,20	1,49 $\pm$ 0,35	1,42 $\pm$ 0,36	1,81 $\pm$ 0,19
Енкефалінамінопептидаза				
Гіпоталамус	22,78 $\pm$ 3,19	14,24 $\pm$ 0,76*	13,98 $\pm$ 0,77*	11,30 $\pm$ 1,17*
Стріатум	22,12 $\pm$ 2,37	22,00 $\pm$ 0,94	17,14 $\pm$ 1,25**	15,41 $\pm$ 0,97*,**
Довгастий мозок	24,88 $\pm$ 3,06	16,00 $\pm$ 1,52*	11,64 $\pm$ 2,03*	11,07 $\pm$ 1,95*
Аденогіпофіз	79,56 $\pm$ 8,04	51,43 $\pm$ 7,65*	101,79 $\pm$ 14,70**	103,54 $\pm$ 17,17**

ногіпофізі до рівня пептиду у контрольних тварин. У довгастому мозку на 10-ту добу після адrenaлектомії рівень лейцин-енкефаліну перевищує вміст пептиду у контрольних тварин (табл. 4).

Після введення адrenaлектомованим тваринам гідрокортизону і АКТГ спостерігається підвищення зниженої після адrenaлектомії величини спе-

Таблиця 4. Вміст лейцин-енкефаліну (пмоль/мг тканини) в мозку та гіпофізі щурів через 10 діб після адrenaлектомії ($M \pm m$, $n = 5$)

Об'єкт дослідження	Контроль	Двобічна адrenaлектомія	Двобічна адrenaлектотомія з введенням гідрокортизону
Гіпоталамус	$0,914 \pm 0,069$	$1,098 \pm 0,158$	$0,773 \pm 0,088$
Стріатум	$0,762 \pm 0,096$	$0,974 \pm 0,089$	$1,232 \pm 0,080$
Довгастий мозок	$0,563 \pm 0,029$	$0,747 \pm 0,058^*$	$0,564 \pm 0,42^{**}$
Аденогіпофіз	$1,373 \pm 0,182$	$1,603 \pm 0,140$	$1,263 \pm 0,122$

цифічного зв'язування ^3H -лейцин-енкефаліну в гіпоталамусі, стріатумі та довгастому мозку щурів. На відміну від мозку, в аденогіпофізі адrenaлектомованих щурів введення гідрокортизону призводить до подальшого зниження специфічного зв'язування міченого ліганду (див. табл. 2). Відмічена також нормалізація вмісту лей-енкефаліну в довгастому мозку після введення адrenaлектомованим щурам гідрокортизону (див. табл. 4). З результатів, наведених в табл. 3 видно, що після введення гідрокортизону та АКТГ адrenaлектомованим тваринам активність енкефалінамінопептидази в гіпоталамусі і довгастому мозку не змінюється і порівняно з контролем залишається зниженою. В аденогіпофізі адrenaлектомованих щурів активність цього ферменту при введенні гормонів підвищується, досягаючи $127,9\text{—}130,1\%$ від контрольного рівня (відповідно).

Таким чином, зниження вмісту лейцин-енкефаліну, виявлене в гіпоталамусі, стріатумі та аденогіпофізі на 7-му добу після адrenaлектомії, відбувається паралельно зі зниженням активності одного з енкефалінгідролізуючих ферментів — енкефалінамінопептидази. Рівень специфічного зв'язування ^3H -лейцин-енкефаліну, який використовується як критерій оцінки вивільнення ендogenous енкефаліну [1], на цей період після видалення наднирників також знижується. Враховуючи відсутність активації енкефалінгідролізуючих ферментів, зниження вмісту лейцин-енкефаліну в гіпоталамусі, стріатумі та аденогіпофізі щурів на 7-му добу після адrenaлектомії, яке відбувається одночасно зі зниженням специфічного зв'язування міченого енкефаліну, очевидно, зумовлене посиленням вивільненням лейцин-енкефаліну з нейросекреторних гранул, тобто ендogenous секрецією опіоїдного пептиду з його наступною дією на більш чи менш віддалені рецептори. За відомим механізмом, зниження кількості зв'язуючих місць на мембранах клітин відбувається у відповідь на тривалу зайнятість опіоїдних рецепторів агоністами, зокрема ендogenous енкефалінами, що вивільняються з секреторних гранул пептидергічних нейронів [17]. Підвищення вмісту лейцин-енкефаліну, що призводить до відновлення його рівня в структурах мозку на 10-ту добу після адrenaлектомії, очевидно, є наслідком адаптивного підвищення синтезу пептиду в цей період.

За даними літератури, вміст іншого опіоїдного пептиду — метіонін-енкефаліну знижується в гіпоталамусі щурів через 24 год після адrenaлектомії і залишається зниженим не менше ніж 6 діб. Відновлення рівня метіонін-енкефаліну в гіпоталамусі спостерігалось через 11 і 18 діб після операції [9]. Підвищений вміст лейцин- і метіонін-енкефалінів в аденогіпофізі щурів було виявлено через 2 тиж після адrenaлектомії [2].

Отже, згідно з нашими результатами та літературними даними, гостра реакція на зміну гомеостазу після адrenaлектомії, що полягає в зниженні вмісту енкефалінів, спостерігається через 24 год після адrenaлектомії і продовжується не менше 7-ми діб. На 10-, 11- та 18-ту добу після адrenaлек-

томії ця реакція змінюється підвищенням вмісту енкефалінів до нормального рівня чи перевищує його.

Слід відзначити, що дослідження, проведені на різних моделях стресорних та екстремальних станів також свідчать про багатозначність змін активності опіоїдних пептидів у структурах мозку і гіпофізі тварин. Показана залежність характеру змін вмісту енкефалінів мозку від тривалості та інтенсивності стресових стимулів. Зниження вмісту енкефалінів і негативна регуляція опіоїдних рецепторів у мозку тварин у ранні строки після іммобілізаційного, гравітаційного стресу та шоку пізніше змінюється підвищенням вмісту та синтезу енкефалінів [3, 4, 13, 14]. Отже, характерним для динаміки рівня енкефалінів після адrenaлектомії та стресу середньої інтенсивності є те, що після посилення вивільнення енкефалінів з ендогених депо настає компенсаторне збільшення синтезу цих пептидів у структурах мозку.

При визначенні специфічного зв'язування ^3H -лей-енкефаліну структурами мозку в наших експериментах було також показано гальмування вивільнення лей-енкефаліну з місць зберігання в гіпоталамусі, стріатумі та довгастому мозку адrenaлектомованих тварин після введення їм гідрокортизону і АКТГ. Подальше зниження специфічного зв'язування міченого енкефаліну в аденогіпофізі адrenaлектомованих щурів після введення гормонів, очевидно, можна пояснити гальмування транспорту нейропептиду з гіпоталамуса в гіпофіз.

Модуляція секреції кортиколіберину, АКТГ і кортикостероїдів здійснюється за допомогою інгібіторної дії ендогенних енкефалінів на рівні гіпоталамуса, гіпофіза та надниркових залоз [11, 12, 14]. Відомо також, що після адrenaлектомії гіпоталамус і гіпофіз залучаються до механізму зворотного зв'язку, беручи участь у забезпеченні гіперреактивності ГГНС [8, 16]. У відповідності з цим, одним із механізмів підвищення секреції кортиколіберину і АКТГ після адrenaлектомії, за нашими результатами, може бути зниження рівня, а отже й гальмівної дії лей-енкефаліну в гіпоталамусі, гіпофізі та в структурах мозку, які містять закінчення пептидергічних нейронів. Нормалізація вмісту лей-енкефаліну в гіпоталамусі, стріатумі та гіпофізі на 10-ту добу після адrenaлектомії може істотно обмежувати подальше посилення секреції АКТГ, рівень якого на цей період досягає плато [16]. Результати про регулюючий вплив гідрокортизону і АКТГ на вміст, рецепцію та інактивацію лей-енкефаліну в гіпофізі, гіпоталамусі, стріатумі адrenaлектомованих тварин також свідчать про залучення енкефаліну цих структур мозку до реалізації зворотних зв'язків у системі ГГНС.

Таким чином, одержані результати свідчать про участь лей-енкефаліну гіпофіза, гіпоталамуса та інших структур мозку в генезі змін нейроендокринної системи після адrenaлектомії, тобто про участь ендогенної енкефалінергічної системи поряд з іншими регуляторними системами в формуванні адаптаційного синдрому за умов адrenaлектомії.

L.N.Kalinskaya, V.Ya.Kononenko

ACTIVITY OF ENKEPHALINERGIC SYSTEM IN BRAIN AND PITUITARY BODY IN EXPERIMENTAL HYPOCORTICOIDISM

Changes in activity of basic components of enkephalinergic system, leu-enkephalin contents, activity of enkephalinohydrolysing enzymes (enkephalinases A and B, enkrphalin aminopeptidases) and ^3H -leu-enkephalin specific biniding to opioide receptor in rat anterior and mediobasal hypothalamus, striatum, medulla oblongata and adenohipophysis have been analysed on experimental models of hypocorticism. No changes in brain and pituitary body leu-enkephalin contents following unilateral adrenalectomy were shown. Bilateral adrenalectomy resulted in two-phase character of neuropeptide

level: a decrease of leu-enkephalin contents in hypothalamus, striatum and adenohepophysis on the 7th day and its increase to the normal level on the 10th day after the operation were revealed. A decrease of leu-enkephalin contents in rat brain on the 7th day following adrenalectomy occurred simultaneously with a decrease in enkephalin aminopeptidase activity and specific binding of labeled leu-enkephalin testifying to strengthening of enkephalin release from neurosecretory granules of brain structures following adrenalectomy. Important changes in leu-enkephalin contents, reception and inactive processes on the level of adenohepophysis and on the level of hypothalamus, striatum and medulla oblongata were detected by cortisol and ACTH administration in adrenalectomised animals.

V.P.Komissarenko Institute of Endocrinology and Metabolism,
Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Беляев Н.А. Состояние энкефалинергической системы мозга крыс при воздействии этанола // Автореф. ... канд. биол. наук. — М. — 1984. — С. 21.
2. Блюм Ф.Е., Росье Дж., Баттенберг Е.Л.Ф. и др. Бета-эндорфин. Локализация в клетке, электрофизиологические и поведенческие эффекты: Эндорфины. — М.: Мир, 1981. — С. 97—117.
3. Вакулина О.П., Тигранян Р.А., Брусов О.С. Содержание опиоидных пептидов в мозге и крови крыс при иммобилизационном стрессе // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1984. — 48, № 11. — С. 537—539.
4. Гомазков О.А., Ростовцев А.П., Комиссарова Н.В. и др. Активность энкефалин- и ангиотензин- 11 образующих пептидаз мозга и периферических тканей в условиях хронического стресса, вызванного гипергравитацией // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 1988. — № 5. — С. 52—57.
5. Жила В.А., Громов Л.А. Выделение опиоидных нейропептидов из мозга и крови и их количественное определение радиоиммунологическим методом // Укр. биохим. журн. — 1984. — 56, № 6. — С. 661—663.
6. Ойвин И.А. Статистическая обработка результатов экспериментальных исследований // Патол. физиология и эксперим. терапия. — 1960. — № 4. — С. 76—85.
7. Рожанец В.В., Русаков Д.Ю., Данчев Н.Д., Вальдман А.В. Влияние хронического применения антидепрессантов на состояние бензодиазепиновых рецепторов головного мозга мыши // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. — 1983. — 46, № 7. — С. 46—48.
8. Филаретов А.А. Принципы и механизмы регуляции гипоталамико-адреналокортикальной системы. — Л.: Наука, 1987. — С. 165.
9. Gibson A., Ginzburd M., Hart S.L., Kitchen I. Enkephalin content in rat hypothalamus-effect of adrenalectomy, laparotomy and corticosteroid treatment // Brit. J. Pharm. — 1979. — 66, № 1. — P. 130.
10. Gorenstein B.C., Snyder S.H. Enkephalinases // Proc. Roy. Soc. — 1980. — 210, № 2. — P. 123—132.
11. Grossmann A., Tsagarakis S. The hunt for the CIA: Factors which demonstrate corticotrophin-inhibitory activity // J. Endocrinol. — 1989. — 123, № 2. — P. 169—172.
12. Hereault S., Barden N. Regulation of proopiomelanocortin messenger RNA concentrations by opioid peptides in primary cell cultures of rat hypothalamus // Mol. Brain. Res. — 1991. — 10, № 2. — P. 115—121.
13. Kanamatsu T., Obie J., Grimes L. et al. Kainic acid alters the metabolism of Met-enkephalin and the level of dynorphin A in the rat hippocampus // J. Neurosci. — 1986. — 6, № 10. — P. 3094—3102.
14. Lightman S.L., Young W.S. Changes in hypothalamic preproenkephalin A mRNA following stress and opiate withdrawal // Nature. — 1987. — 328, № 6131. — P. 643—645.
15. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Lewis A. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1951. — 193, № 1. — P. 265—275.
16. Weidenfeld J., Siegel R.A., Conforti N., Chowder J., Feldman S.A. A temporal study of post-adrenalectomy increase in ACTH secretion in the rat: effect of various hypothalamic deafferentations // Brain Res. — 1984. — 322, № 2. — P. 329—331.
17. Zukin R.S., Tempel A. Neurochemical correlates of opiate receptor regulation // Biochem. Pharmacol. — 1986. — 35, № 10. — P. 1623—1627.

Ін-т ендокринології та обміну речовин
ім.В.П.Комісаренка АМН України, Київ

Матеріал надійшов
до редакції 05.04.94