

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОГОРМОНА С НА АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ МОЗГА И СЕРДЦА КРЫС

А. А. ГАЛОЯН, Б. Я. ГУРВИЦ

Исследовалось влияние коронароактивного нейрого르몬а С, выделенного из гипоталамуса крупного рогатого скота, на активность фермента аденилатциклазы, осуществляющего синтез 3',5'-циклического аденозинмонофосфата. Установлено, что нейрого르몬 С не влияет на активность аденилатциклазы гомогенатов мозга и сердца крыс *in vitro* в заданных условиях. По-видимому, действие нейрого르몬а С на метаболизм 3',5'-циклического аденозинмонофосфата происходит лишь путем ингибирования активности фосфодиэстеразы.

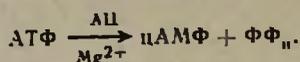
Медиаторная роль 3',5'-циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) в реализации действия большинства известных гормонов [1, 2], нейротрансмиттеров [3, 4], лекарственных и других биологически активных веществ [5, 6], кардиостимулирующие эффекты цАМФ и его производных [7—10], а также ингибирование фосфодиэстеразы (ФДЭ) под влиянием многих спазмолитических и сосудорасширяющих веществ [11—14] позволяют предположить участие ферментов синтеза и распада 3',5'-цикло-АМФ в механизме действия нейрого르몬а С, одного из низкомолекулярных коронароактивных соединений, выделенных нами из гипоталамуса крупного рогатого скота [15].

Ранее нами было показано, что под влиянием нейрого르몬а С происходит значительное стимулирование гликолиза, особенно в сердечной мышце, увеличение фосфорилазной активности, расщепление гликогена, накопление лактата и т. д. [16, 17]. Кроме того, нами получены данные, свидетельствующие о мощном ингибирующем действии нейрого르몬а С на ФДЭ сердца и мозга крыс *in vitro* [18].

Выяснение вопроса о том, ограничивается ли влияние нейрого르몬а С на метаболизм цАМФ только блокированием активности ФДЭ, или его участие в регуляции уровня цАМФ происходит также в результате воздействия на фермент биосинтеза цАМФ—аденилатциклазу, имеет важное значение для уточнения места воздействия нейрого르몬а С в эффекторной клетке.

В настоящей работе приводятся результаты исследования влияния нейрого르몬а С на активность аденилатциклазы (АЦ), одного из возможных звеньев в реализации физиологического эффекта этого вещества.

Материал и методика. Активность АЦ определяли по количеству цАМФ, образованного в процессе инкубации гомогенатов мозга и сердца крыс при 37°, рН 7,5, из экзогенного АТФ по схеме:



В качестве маркера применяли α - ^{32}P -АТФ. Разделение синтезированного под действием аденилатциклазы ^{32}P -цАМФ от других радиоактивных продуктов реакции проводили с помощью колоночной хроматографии. Принцип колоночного разделения состоит в преимущественной адсорбции поливалентных катионов на окись алюминия [19, 20]. АТФ, АДФ и АМФ, являясь поливалентными катионами при нейтральном рН, почти полностью сорбируются, а цАМФ—моновалентный анион—элюируется с колонок. Присутствующие в элюате пурины и нуклеозиды при применении ^{32}P -АТФ не радиоактивны, в отличие от случаев, когда в качестве субстрата используются ^3H -АТФ или ^{14}C -АТФ. Это обстоятельство позволяет однозначно и с большой точностью определять содержание цАМФ в исследуемых пробах.

Опыты проводили на белых крысах (200—300 г). Исследуемые органы (мозг, сердце) быстро измельчали, промывали холодным раствором 0,32 М сахарозы и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. Гомогенизацию ткани мозга производили вручную в 10 объемах 50 мМ трис-НСl буфера, рН 7,5, содержащего 2 мМ этилен гликоль bis (β -аминоэтилэфир)-N,N'-тетрауксусная кислота (ЭГТА) в течение 30 сек. Ткань сердца, предварительно измельченную ножницами, гомогенизировали в 5 объемах того же буфера в течение 90—100 сек. Процесс несколько раз прерывали для промежуточного кратковременного охлаждения гомогената в специальных сосудах с сухим льдом. Подобные меры необходимы в связи с лабильностью АЦ, инактивирующейся при интенсивной и длительной гомогенизации.

Инкубацию проводили в 0,5 мл среды, содержащей $4 \cdot 10^{-2}$ М трис-НСl, рН 7,5, $3,3 \cdot 10^{-3}$ М, $0,5 \cdot 10^{-2}$ М теофиллин, $1,5 \cdot 10^{-3}$ М, ^{32}P -АТФ с удельной радиоактивностью 20 мкюри/ммоль, гомогенат, соответствующий 6,7 мг сырой ткани мозга (0,6 мг белка), или 13,4 мг сырой ткани сердца (0,87 мг белка). Нейрогормон С вносили в гомогенат непосредственно перед помещением его в инкубационную среду. Содержание его в пробе составляло 30 мкл (15 миллиединиц)*. Контрольные пробы содержали 30 мкл бидистиллата. Кроме того, в качестве контроля использовали пробы, инкубированные без фермента; фермент добавляли непосредственно перед остановкой реакции. NaF применяли в концентрации 10^{-2} М. Началом реакции считали момент добавления фермента (гомогената) с температурой 0° к остальным компонентам инкубационной смеси, которые выдерживались при комнатной температуре из-за плохой растворимости теофиллина при 0°. Инкубацию проводили в термостате при 37° в течение 5 мин. Для остановки реакции пробирки опускали в кипящую водяную баню на 3 мин. После охлаждения до комнатной температуры пробы центрифугировали (2000 г, 20 мин) и 0,35 мл супернатанта наносили на колонки (0,4×4,5 см), заполненные сухим порошком нейтральной окиси алюминия. В качестве элюирующего буфера использовали 3 мл 10 мМ трис НCl, рН 7,5.

Для определения профиля элюации и потерь цАМФ в некоторые пробы по окончании процесса инкубации добавляли 20 мкл 40 мМ трисНСl буфера, содержащего $8\text{-}^3\text{H}$ цАМФ (0,01 мкюри). Элюируемые фракции, объем которых составлял 1 мл, собирали в сцинтилляционные кюветы с 10 мл диоксанового сцинтиллятора. Уровень радиоактивности определяли с помощью жидкостного сцинтилляционного спектрометра типа SL-40 (Франция) по специальной программе, предусматривающей разделение каналов для одновременного счета ^{32}P и ^3H . Принадлежность тритиевой метки, содержащейся в элюате, ^3H цАМФ определяли с помощью тонкослойной хроматографии на силикагеле с использованием стандартных пластин «Силуфол UV-254». Исследуемые

* 1 миллиединица нейрогормона С ингибирует 1 миллиединицу фосфодиэстеразы 3',5'-цАМФ.

Фракции после предварительного концентрирования наносили на пластины в объеме 3 мкл и хроматографировали в системе и-бутанол-ацетон- NH_4OH (8:2:1). Пятна идентифицировали с помощью свидетелей в ультрафиолете, фиксировали, вырезали и помещали в сцинтилляционные кюветы с толуольным сцинтиллятором.

В каждом опыте использовали по 3 параллельные пробы. Содержание белка определяли по методу Лоури [21].

В качестве осевых материалов применяли: АТФ, теофиллин, ЭГТА фирмы Сигма (США), α - ^{32}P -АТФ (8,2 кюри/ммоль и 8- ^3H цАМФ (22,1 кюри/ммоль) фирмы New England, Nuclear (США), нейтральную окись алюминия по Брокману фирмы Reanal (Венгрия), пластины «Силуфол UV-254» фирмы Kavalier (Чехословакия) и др.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 показан профиль элюации с колонок с окисью алюминия. Более 65% первоначального уровня метки ^3H , нанесенной на колонку ($6-7 \cdot 10^4$ имп/мин), элюируется в первых двух фракциях, в то время как уровень счета ^{32}P в этих фракциях не превышает 0,013% исходного ($2-3 \cdot 10^7$ имп/мин).

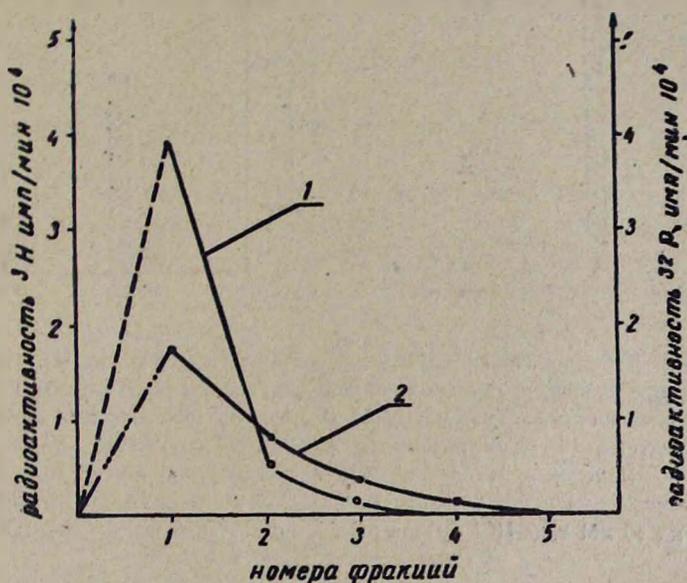


Рис. 1. Хроматографическое разделение цАМФ и АТФ на колонках (0,4×4,5 см) с нейтральной окисью алюминия. На колонку нанесено 0,35 мл 40 мМ трис HCl буфера, рН 7,5, содержащего ^3H -цАМФ (0,1 мккюри) и α - ^{32}P -АТФ (10 мккюри). Элюирующий буфер 10 мМ трис HCl , рН 7,5. Объем каждой фракции 1 мл. 1—радиоактивность ^3H , 2—радиоактивность ^{32}P .

Характер распределения метки показан на рис. 2, из которого видно, что подавляющая часть метки сосредоточена в пятне ^3H цАМФ. На основании хроматографического разделения исходного препарата ^3H цАМФ в аналогичных условиях можно заключить, что около 80% радиоактивности содержится в пятне ^3H цАМФ, 15—в пятне $5'\text{AMF}$, 3—аденозина, в остальных частях хроматограммы радиоактивность не превышает уровня фона. Расчеты показывают, что потери ^3H цАМФ при элюировании его с колонок с окисью алюминия составляют около 22%

по сравнению с содержанием их в пробах, наносимых на колонки. Эта величина учитывалась при расчете количества ^{32}P -цАМФ, образованного из α - ^{32}P -АТФ.

На рис. 3 показаны уровни цАМФ, синтезированного в процессе инкубации АТФ с гомогенатами сердца и мозга. Нейрогормон С не вызывает сколько-нибудь заметных изменений в количестве образовавшегося цАМФ под действием АЦ как мозга, так и сердца крыс. Известный активатор АЦ NaF (10 мМ) в аналогичных условиях приводит к значительному увеличению уровня цАМФ под действием гомогенатов сердца и мозга по сравнению с контролем.

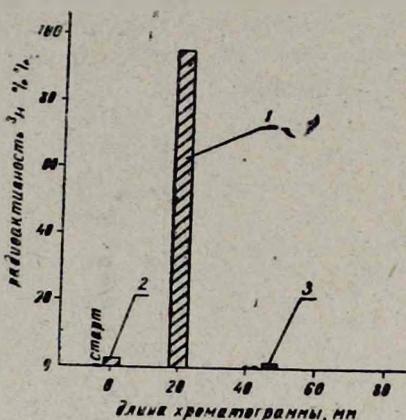


Рис. 2.

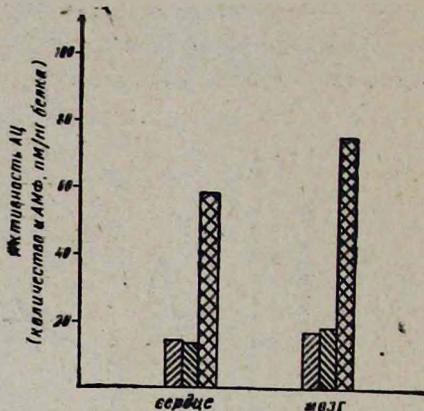


Рис. 3.

Рис. 2. Тонкослойная хроматография фракций, содержащих ^3H , элюированных с колонок с окисью алюминия, на пластинах «Силуфол UV-254» в системе н-бутанол-ацетон- NH_4OH (8:2:1). За 100% принята суммарная радиоактивность хроматограммы. 1—цАМФ, 2—5'АМФ, 3—аденозин.

Рис. 3. Изменение активности АЦ при инкубации гомогенатов сердца (0,87 мг белка) и мозга (0,6 мг белка) крыс с экзогенным АТФ (1,5 мМ) в 0,5 мл 40 мМ трис HCl буфера pH 7,5, при 37° в течение 5 мин. //—контроль, ▨—нейрогормон С, ⊠—10 мМ NaF.

Полученные в условиях нашего эксперимента количества цАМФ, образованного в процессе инкубации из экзогенного АТФ, в контроле, а также под влиянием NaF хорошо согласуются с литературными данными [22—24].

Инкубация тканей мозга и сердца в присутствии стандартного препарата фосфодиэстеразы (0,2 мед) в пробах, лишенных теofilлина, приводила к полному уничтожению стимулирующего эффекта NaF. Следовательно, фиксируемое нами повышение радиоактивности в пробах, содержащих NaF, свидетельствует об активации АЦ и соответствующем увеличении уровня образовавшегося цАМФ.

Итак, на основании проведенных нами экспериментов можно прийти к заключению, что нейрогормон С не влияет на активность АЦ гомогенатов мозга и сердца крыс *in vitro* в заданных условиях. По-видимому, блокирование гидролиза цАМФ вследствие мощного ингибирования

ФДЭ под действием нейрогормона С [18] оказывается достаточным для достижения необходимого уровня цАМФ без дополнительной активации системы биосинтеза цАМФ с участием АЦ.

Не исключена возможность, что нейрогормон С, минуя аденилциклазный барьер на поверхности клеток сердца и мозга, поступает во внутрь клетки, оказывая ингибирующее влияние на ФДЭ внутриклеточных органелл.

В настоящее время нами проводятся исследования для выяснения преимущественного влияния нейрогормона С на активность ФДЭ, локализованных в различных мембранах внутриклеточных органелл.

Институт биохимии АН АрмССР

Поступило 17.11 1978 г.

ՆԵՅՐՈՆՈՐՄՈՆ Շ-Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՈՒՂԵՂԻ ԵՎ ՍՐՏԻ
ԱԴԵՆԻԿԱՏՑԻԿԼԱՉԱՑԻՆ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ, Բ. ՅԱ. ԳՈՐՎԻՑ

Ուսումնասիրվել է նեյրոհորմոն Շ-ի ազդեցությունը օրտի և ուղեղի ադենիլատցիկլազայի վրա:

Կատարված հետազոտությունները ցույց են տվել, որ նեյրոհորմոն Շ-ն չի ազդում սրտի և ուղեղի հոմոգենատների ադենիլատցիկլազայի վրա:

Հնարավոր է, որ նեյրոհորմոն Շ-ն ֆոսֆոդիէսթերազայի վրա թողնում է արդիակող ազդեցություն՝ շրջանցելով ադենիլատցիկլազային անշրպետը:

THE INFLUENCE OF NEUROHORMONE „C“ ON ADENYLATE
CYCLASE ACTIVITY OF RAT BRAIN AND HEART

A. A. GALOYAN, B. Y. GURVITZ

The aim of this paper was to study the effect of neurohormone „C“ on the adenylate cyclase of rat brain and heart tissues.

The experiments carried out show that neurohormone „C“ hasn't affected the activity of the above-mentioned enzyme. Probably, neurohormone „C“ exerts its inhibiting action on the phosphodiesterase avoiding the adenylate cyclase barrier.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Robinson G. A., Butcher R. W. et al. Ann. Rev. Biochem., 37, 149, 1968.
2. Major R. W., Kilpatrick R. J. Endocr., 52, 593, 1972.
3. Entman M. L., Levey G. S. Circ. Res., 25, 429, 1969.
4. George W. Y., Polson Y. B. et al. Proc. Nat. Acad. Sci., 66, 398, 1970.
5. Abell C. W., Sandarallgan M. Natur. New Biol., 244, 136, 1973.
6. Bitensky M. W., Gorman J. S. Progr. Biophys. Mol. Biol., 26, 411, 1973.
7. Kukowetz W. R., Pösch G. L. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac., 266, 236, 1970.
8. Skelton C. L., Levey G. S. et al. Circ. Res., 26, 35, 1970.
9. Krause E. G., Halle W. et al. J. Mol. Cell. Cardiol., 1, 1, 1970.

10. *Triner L. M., Vulliamoz Y. et al.* Fed. Proc., 30, 383, 1971.
11. *Pösch G. L., Juan H. et al.* Naunyn-Schmiederg's Arch. Pharmac., 264, 293, 1969.
12. *Kukowetz W. R., Pösch G. L.* Naunyn-Schmiederg's Arch. Pharmac., 267, 189, 1970.
13. *Pösch G. L., Kukowetz W. R.* Life Sciences, 10, 133, 1971.
14. *Kukowetz W. R., Juan H. et al.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmac., 264, 262, 1969.
15. *Галоян А. А.* Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции. Ереван, 1965.
16. *Галоян А. А., Алексанян С. С. и др.* ДАН АрмССР, 60, 2, 117, 1975.
17. *Алексанян С. С., Галоян А. А.* ДАН АрмССР, 60, 5, 293, 1975.
18. *Галоян А. А., Гурвиц Б. Я., Погосян М. А.* Вопросы биохимии мозга. Ереван, 11, 89, 1976.
19. *Ramachandran J.* Anal. Biochem., 43, 227, 1971.
20. *White A. A., Zenser T. V.* Anal. Biochem., 41, 372, 1971.
21. *Lowry O. H., Rosenbrouch N. J. et al.* J. Biol. Chem., 193, 265 1951.
22. *Salmon V., Londos C. et al.* Anal. Biochem., 58, 541, 1974.
23. *Krishna G., Weiss B. et al.* J. Pharmacol. Exp. Therap., 163, 379, 1968.
24. *Entman M. L., Levey G. S. et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun., 35, 728, 1969.