

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 577.15+616.833—018:616.447

## ВЛИЯНИЕ ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА НА СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В НЕРВНОЙ ТКАНИ

ТЕР-МАРКОСЯН А. С., ХУДАВЕРДЯН Д. Н.

Ереванский государственный медицинский институт

Особое место в клеточной и молекулярной эндокринологии занимает изучение механизмов восприятия, переработки и реализации гормонального сигнала клеткой. В наших предыдущих исследованиях [1, 2] по изучению действия паратиреоидного гормона (ПТГ) на нервную ткань были выявлены феномен его рецепции мембраной синапсосомы коры головного мозга крыс, нейроном околоушного ганглия улитки *Helix* и нарушение синаптической передачи, то есть были выяснены начальное и конечное звенья гормонального воздействия.

Как известно, влияние ПТГ на клетки, признанные в качестве мишеней, осуществляется по сАРМ-зависимому механизму [3, 4]. Если допустить, что аналогичным образом осуществляется действие ПТГ и на нейроны, то следует ожидать однонаправленные изменения в них и со стороны содержания циклических нуклеотидов.

Целью настоящего исследования явилось изучение сдвигов уровня сАРМ и сГМР в синапсосомах крыс и ганглиях улитки, что дало бы возможность оценить хеморецептивную способность нейрональных мембран в эволюционном аспекте. Эти исследования важны как для оценки влияния ПТГ на передачу информации с мембраны на внутриклеточные структуры, так и на запуск выброса нейромедиатора пресинаптическими структурами [5, 6].

Объектом исследования служили белые беспородные крысы-самцы массой 190—200 г и улитки *Helix*.

Синапсосомы, выделенные из коры головного мозга крыс методом Najos [7], в количестве 50 мкг белка инкубировали в среде, содержащей (в мМ): NaCl—145, KCl—5, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>—1,5, MgCl<sub>2</sub>—1,3, CaCl<sub>2</sub>—0,02, глюкозу—10, трис-HCl—20, pH 7,4, при 37°. ПТГ в виде паратиреоидной субстанции («Sigma», США) добавляли в инкубационную среду в концентрации 10<sup>-9</sup> М, а через 20 мин вводили в раствор ЭДТА в концентрации 5·10<sup>-3</sup> М и смесь центрифугировали при 15 000 об/мин в течение 15 мин. К осадку добавляли 1 мл абсолютного спирта и через 5 мин центрифугировали при 10 000 об/мин

протяжении 15 мин. Для определения сАМР и сGMP экстракт в количестве 0,5 мл разливали по пробиркам, предварительно высушив его под вакуумом при 55°.

Для изучения действия ПТГ *in vivo* крысам в течение 7 дней внутримышечно вводили ПТГ из расчета 0,5 ед/100 г массы животного. Выделение синапсом и экстракцию циклических нуклеотидов проводили по вышеописанным методам. Параллельно в сыворотке крови животных определяли содержание общего кальция, фосфора, ионизированного кальция, калия и натрия. Первые два параметра определяли атомно-адсорбционным методом, а остальные—при помощи ионселективного анализатора Microlyte («Копе», Финляндия).

Отирецированные окологлоточные ганглии улиток инкубировали в среде, содержащей (в мМ): NaCl—85, KCl—4, CaCl<sub>2</sub>—7, MgCl<sub>2</sub>—14, глюкозу—10, трис-HCl—10, рН 7,6 при 18°. Опытные пробы инкубировали с ПТГ в концентрации 10<sup>-10</sup> М. Выбор различных концентраций ПТГ для синапсом (10<sup>-9</sup> М) и ганглиев (10<sup>-10</sup> М) обусловлен их максимальным эффектом на вход Ca<sup>2+</sup> в эти структуры [2, 8]. После инкубации в течение 20 мин ганглии гомогенизировали в 0,3 мл 50 мМ раствора трис-HCl, содержащего 5 мМ ЭДТА, рН 7,4. К гомогенату добавляли 2 мл абсолютного этанола и через 5 мин центрифугировали его при 10000 г в течение 15 мин. Для определения сАМР и сGMP надосадочную жидкость (экстракт) высушивали под вакуумом при температуре 55°. Для определения их содержания в экстрактах пользовались стандартными наборами («Amersham», Англия) и выражали его в синапсомах в пмоль/мг белка, а в ганглиях—в пмоль/мг массы ткани. Количество белка в пробах определяли методом Izhaci, Gilл [9], а статистическую обработку полученных результатов проводили методом Стьюдента—Фишера.

Как явствует из табл. 1, под действием ПТГ имеет место увеличение содержания сАМР и особенно сGMP соответственно на 85 и 57%. Интенсификация процесса образования сАМР происходит и в синапсомах, где уровень нуклеотида по сравнению с контролем возрастает примерно вдвое. Противоположные сдвиги, хотя и статистически недостоверные, прослеживаются в отношении содержания сGMP.

Как вытекает из результатов, приведенных в табл. 2, многократные внутримышечные введения ПТГ сопровождаются проявлением однотипных сдвигов в виде повышения в нервных окончаниях *in vivo* уровней сАМР и сGMP более чем в 1,5 и 2 раза по сравнению с контролем соответственно. При этом выявлена тенденция к увеличению в сыворотке крови содержания ионизированного кальция и понижению количества общего фосфора.

Эти результаты, наряду с ранее полученными данными [2, 8] по повышению уровня Ca<sup>2+</sup> в нервной клетке под влиянием ПТГ, проливают свет на высказанное нами мнение [10] о стимулирую-

нием действия ПТГ на процесс фосфорилирования мембранных белков путем активирования сАМР-, сGMP- и  $Ca^{2+}$ -зависимых протеинкиназ. В реализации механизма выброса нейромедиатора ключевое место занимает фосфорилирование белков нервных окончаний [11, 12]. По имеющимся данным [13, 14], одним из возможных механизмов высвобождения ГАМК является везикулярный путь, а

Таблица 1

Влияние паратиреоидного гормона на сдвиги содержания сАМР и сGMP в синапсосамах коры головного мозга крыс (в пмоль/мг белка) и нейронах окологлоточного ганглия улитки *Helix* (в пмоль/мг массы ткани) *in vitro*

Объект	Условия опыта	сАМР	сGMP
Синапсосы	контроль	$16,28 \pm 1,58$ n=5	$2,78 \pm 0,88$ n=5
	ПТГ $10^{-9}$ М	$23,12 \pm 3,34^{**}$ n=7	$0,74 \pm 0,4$ n=7
Нейрон	контроль	$0,4 \pm 0,04$ n=16	$0,04 \pm 0,003$ n=8
	ПТГ $10^{-10}$ М	$0,6 \pm 0,1^*$ n=9	$0,07 \pm 0,008^{**}$ n=8

Таблица 2

Содержание сАМР и сGMP (в пмоль/мг белка) в синапсосамах коры головного мозга и  $Ca$ ,  $P$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  (в ммоль/л) в крови крыс после ежедневного внутримышечного введения в течение 7 дней паратиреоидина в дозе 0,5 ед/100 г массы животного

Условия опыта	сАМР	сGMP	Ca	P	$Ca^{2+}$	$K^+$	$Na^+$
Контроль n=3	$8,93 \pm 0,61$	$4,93 \pm 0,38$	$2,04 \pm 0,05$	$2,02 \pm 0,29^*$	$0,77 \pm 0,08$	$7,5 \pm 0,61$	$145,5 \pm 2,63$
Паратиреоидин n=5	$14,17 \pm 0,86^{**}$	$13,97 \pm 2,9^{**}$	$1,96 \pm 0,04$	$1,52 \pm 0,20^*$	$0,89 \pm 0,04$	$6,70 \pm 0,25$	$157,08 \pm 10,49$

Примечание: \*—достоверные отличия от контроля ( $p < 0,05$ ); \*\*—достоверные отличия от контроля ( $p < 0,01$ ); n—число наблюдений.

фигурирующий в его основе процесс фосфорилирования белков везикул и пресинаптической мембраны, являющийся лимитирующим звеном взаимодействия везикул с пресинаптической мембраной, по всей вероятности, является определяющим. Не исключено, что изменение содержания сАМР и сGMP в синапсосамах может обусловить установленную нами ранее [2] активацию спонтанного выброса тормозного нейромедиатора ГАМК нервными окончаниями коры головного мозга крыс под влиянием ПТГ. Поэтому на основании приведенного нами фактического материала можно заключить, что сдвиги в содержании сАМР и сGMP в нервной ткани могут играть решающую роль в переработке и реализации эффекта ПТГ. На основании полученных результатов можно сделать вывод об универсальном влиянии ПТГ на нервную ткань животных, стоящих на различных ступенях эволюционного развития.

# THE EFFECT OF PARATHYROID HORMONE ON CYCLIC NUCLEOTIDE CONTENTS IN NEURONAL TISSUE

TER-MARKOSIAN A. S., HEDAVERDIAN D. N.

State Medical Institute, Yerevan

The contents of cAMP and cGMP in rat brain cortex synaptosomes and *Helix pomatia* ganglia neurones under the parathormone influence was studied by radioimmunological assay. The level of two nucleotides increased in ganglia in vitro parathormone influence condition and rat synaptosomes after the injections in a week daily of parathyroidine in dose 0,5 unit/100 g mass. The influence of parathormone in vitro on synaptosomes is accompanied by the increase of only cAMP contents.

It was discussed the role of cyclic nucleotides in the mechanism of realising neuromediators from synaptosomes by phosphorylation of proteins of vesicle and presynaptic endings.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Худавердян Д. Н., Тер-Маркосян А. С., Саргсян Г. Р. Нейрохимия, т. 8, № 2, с. 210—215, 1989.
2. Луценко В. К., Тер-Маркосян А. С., Хлебникова Н. Н., Худавердян Д. Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., т. 103, № 8, с. 146—149, 1987.
3. Aurbach G. D., Chase L. R. Fed. proc., v. 29, № 4, p. 1179—1183, 1970.
4. Murad F., Weitzman R. In Endocrinology, Amsterdam, Excerpta Medical., p. 468—473, 1973.
5. Greengard P., Kebabian J. W. Fed. proc., v. 33, p. 1059—1067, 1974.
6. Rauch N., Roskoski R. J. J. Neurochem., v. 43, p. 755—762, 1974.
7. Hajos F. Brain Res., v. 91, p. 485—489, 1975.
8. Худавердян Д. Н., Тер-Маркосян А. С., Айрапетян С. Н. — В кн.: Кальцийрегулирующая система в норме и патологии (под ред. Д. Н. Худавердяна), с. 21—26, Ереван, Айастан, 1988.
9. Itzhaki R., Gill D. Anal. Biochem., v. 9, № 4, p. 401—420, 1964.
10. Худавердян Д. Н., Тер-Маркосян А. С., Айрапетян С. Н. — В кн.: Четвертый съезд Армянского физиологического общества, Ереван, АН АрмССР, с. 93—94, 1987.
11. Северин Е. С., Кочеткова М. Н. Роль фосфорилирования в регуляции клеточной активности, М., Наука, 1985.
12. Burke B. E., DeLorenzo R. J. Neurochem., v. 33, p. 1059—1067, 1974.
13. Lohdesmaki P., Karpdinen A., Saarni H. Brain Res., v. 138, № 2, p. 295—308, 1977.
14. Zisapic N., Zurgil N. Life Sci., v. 23, p. 231—235, 1978.

Поступила 9. VII. 1991