

УДК 577.06:578.61:591.415

АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА МИКРОЦИРКУЛЯТОРНОГО РУСЛА
НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС

РОСТОМЯН М. А., АБРАМЯН К. С., КАЛАШЯН С. П.

Институт биохимии им. Г. Х. Бунятыяна НАН Армении, Ереван

Проведено исследование чувствительности аденилатциклазы (АЦ) надпочечников крысы к действию условий, связанных с гистохимическим выявлением фермента. Опыты с различной длительностью фиксации и варьированием состава инкубационной смеси позволили показать множественный характер распределения АЦ. Примечательно, что АЦ, локализованная в различных структурных образованиях надпочечника— волокнух интрамурального ганглия, секреторных гранулах и капиллярах, отличается неодинаковой чувствительностью к действию этих факторов. Наибольшей чувствительностью отличается микроциркуляторное русло, АЦ которого может быть выявлена лишь при щадящих условиях, предполагающих подбор соответствующих фиксирующих смесей, уменьшение их ингибирующего действия сокращением времени воздействия, а также снижение концентрации ионов свинца. Различная чувствительность, а следовательно, и отличающиеся свойства АЦ указанных компонентов надпочечника рассматриваются в связи с особенностями регуляции этой сложной железы внутренней секреции.

Ранее сообщалось о возможности светомикроскопического выявления АЦ в интрамуральном нервном ганглии надпочечников с помощью гистохимической реакции, основанной на связывании и последующей визуализации нирофосфата, выделяющегося из субстрата под влиянием активности АЦ [1].

Изучение чувствительности этой реакции к различным эффекторам показало, что она активируется норadreналином и может изменяться под влиянием факторов, действующих на гормональный фон организма. В частности, было показано, что при тиреодэктомии [2] и действии адренолитиков [3] резко нарастает чувствительность АЦ именно к тем гормонам, уровень которых был снижен под влиянием экспериментальных воздействий. Все эти факты указывали на то, что АЦ, выявляемая гистохимическими методами, может сохранять не только активность, но и чувствительность к различным эффекторам. Однако при этом озадачивал тот факт, что активность проявлялась только в интрамуральном нервном ганглии мозгового слоя. Между тем, известно, что, несмотря на чрезвычайно высокую лабильность АЦ надпочечников, ее активность довольно высока не только в мозговом, но и в корковом слое [4, 5].

Позднее с помощью аденилиамидодифосфата (АИДФ) было показано, что АЦ гистохимическим методом может быть обнаружена также в гранулярном компоненте надпочечника, и в частности в хромоаффинных гранулах [6]. Согласно данным литературы, активность АЦ хромоаффинных гранул составляет всего лишь 10—15% от активности всего мозгового слоя [7]. Это указывало на то, что немалая доля активности АЦ надпочечников не выявляется и теряется в процессе препарирования материала для гистохимического выявления АЦ.

Целью настоящей работы является исследование влияния различных факторов, связанных с обработкой материала, на активность АЦ и выделение клеток или структур надпочечника, отличающихся повышенной чувствительностью АЦ к различным этапам процедуры выявления этого фермента.

Материалы и методы

Гистохимическое выявление АЦ проводили по прописи, предложенной ранее [1, 6], с варьированием условий фиксации материала.

Исследования проведены на замороженных срезах надпочечников более ста крыс, фиксированных интраартериальной перфузией. Для наркотизирования животных применяли эфир и нембутал. В качестве фиксирующих смесей использовали 2,5%-ный глутаральдегид на физиологическом растворе, на 0,1 М трис-малеатном или 0,1 М каодиловом буфере, рН 7,4, 1%-ный параформальдегид на 0,1 М каодиловом или трис-малеатном буфере и 1%-ную смесь параформальдегида с 1,25%-ным глутаральдегидом на трис-НСI буфере, рН 7,4. Срезы готовили сразу после перфузии животного фиксирующей смесью, а также через 1—3 и 18—20 ч после дополнительного фиксирования перфузированных надпочечников погружением в фиксатор такого же состава.

Инкубацию срезов проводили при температуре 32—34° в течение 5—60 мин. Время инкубации зависело от примененных фиксирующих смесей и условий фиксации материала.

Использовали следующий состав инкубационной смеси: 0,1 М трис-малеатный, трис-НСI или каодиловый буфер, рН 7,4, с 8% глюкозы или сахарозы, в качестве субстрата употребляли 0,5 ммоль АТР с примесью ванадия («Sigma», США) или 0,5—1 ммоль АИДФ («Sigma»), 4 ммоль сернокислого магния, 2 ммоль теофиллина («Sigma») и 1,5—4,8 ммоль азотнокислого свинца, добавляемого в инкубационную среду непосредственно перед употреблением. После инкубации срезы последовательно промывали в воде, в 1%-ной уксусной кислоте — 1 мин, в дистиллированной воде и 5 мин в 0,5%-ном растворе сульфида натрия для визуализации пирофосфата свинца, маркирующего места проявления ферментативной активности. Срезы после промывки монтировали на предметные стекла и заключали в глицерин-желатину. Продукт ферментативной реакции в виде темного осадка отлагался в местах проявления активности АЦ.

Для определения специфичности реакции проведены следующие контрольные инкубации: без субстрата, с тепловой денатурацией, с замещением АТР на другие фосфатсодержащие субстраты, такие как АМР, АДР и АИДФ. Кроме того, в состав инкубационной среды вводили ингибиторы ферментов — кислой фосфатазы (тарtrato), щелочной фосфатазы (цистеин) и АТРаз (уабани, фторид натрия).

Данные контрольных экспериментов показали, что в материале, инкубированном в среде без субстрата, реакция не проявляется. При нагревании срезов до 70° в течение 5 мин и их последующей инкубации в среде для выявления АЦ, окраска резко ослаблялась и полностью исчезала в срезах, прогретых до 80°. Отсутствие реакции после теплового воздействия свидетельствует о ферментативном характере реакции и об отсутствии осадков, обусловленных неэнзиматическим гидролизом АТР ионами свинца. При инкубации срезов с другими, неспецифическими для АЦ фосфатсодержащими субстратами — АМР и АДР, окраска в них не проявлялась. Результаты по инкубации срезов с АИДФ, выявившие некоторые особенности реагирования различных структурных компонентов надпочечника, будут изложены ниже. Добавление в инкубационную среду ингибиторов кислых, щелочных фосфатаз и нуклеозидтрифосфатаз не снимало реакцию. Эти факты свидетельствуют о том, что применяемая реакция на АЦ обусловлена именно этим, а не каким-либо другим ферментом, при действии которого высвобождаются фосфаты.

Результаты и обсуждение

В ранее проведенных исследованиях АЦ выявляли на замороженных срезах надпочечников крыс после перфузии 2,5%-ным забуференным глютаральдегидом и дополнительной фиксации материала в фиксирующей смеси такого же состава в течение 18—20 ч. После 30—60-минутной инкубации срезов в среде, предназначенной для выявления АЦ и содержащей в качестве субстрата АТР, реакция проявлялась в нервных волокнах интрамурального нервного ганглия мозгового слоя. Четкое окрашивание воспроизводилось у всех интактных животных и напоминало картину, получаемую при импрегнации препаратов серебром.

При менее продолжительной (1—3 ч) дополнительной фиксации надпочечников и последующем выявлении АЦ, кроме нервных волокон интрамурального ганглия, иногда окрашиваются и капилляры, преимущественно коркового слоя. Причем интенсивность окраски по периферии среза выражена слабее или вообще отсутствует. Это, по всей вероятности, можно объяснить большей длительностью воздействия фиксатора на поверхностные слои надпочечника, в связи с чем активность фермента по периферии среза ингибируется сильнее по сравнению с глубинными областями органа.

При гистохимическом исследовании АЦ непосредственно после фиксации крыс перфузией, то есть при условии, когда длительность

воздействия фиксатора минимальна и не превышает нескольких минут, в срезах надпочечников, наряду с интенсивно окрашенными нервными волокнами интрамурального нервного ганглия, в мозговом слое можно видеть окрашенную сеть кровеносных капилляров. В корковом слое надпочечников капилляры окрашены несколько слабее и имеют преимущественно радиальную направленность между клетками столбчатого слоя. Иными словами, при кратковременной фиксации глутаральдегидом интенсивность реакции на АЦ капилляров мозгового слоя несколько выше, чем капилляров коркового слоя, но ее чувствительность к ингибирующему действию глутаральдегида выражена сильнее, чем в корковом слое.

Описанные результаты свидетельствуют о том, что удлинение времени фиксации материала приводит к постепенному ослаблению и исчезновению реакции в капиллярах, тогда как реакция на АЦ в нервном ганглии проявляется всегда четко. Из этих данных напрашивается вывод о том, что АЦ кровеносных капилляров надпочечников значительно чувствительнее к ингибирующему влиянию глутаральдегида, чем в нервных волокнах интрамурального ганглия, в связи с чем через сутки после дополнительной фиксации никакой реакции на АЦ в кровеносных капиллярах выявить не удается.

Однако опыты показали, что потеря активности АЦ в капиллярах наблюдается не только после длительной фиксации надпочечников, но и при хранении кратковременно фиксированных срезов надпочечников в буферном растворе (в холодильнике) в течение ночи. Если проследить во времени потерю активности АЦ при хранении срезов надпочечников в буфере и сопоставить с данными по длительности действия глутаральдегида, можно отметить, что снижение активности при хранении в буфере несколько меньше, чем под влиянием глутаральдегида. Эти факты свидетельствуют о чрезвычайно высокой лабильности АЦ, локализованной в капиллярах коркового и, особенно, мозгового слоя надпочечников. Активность АЦ резко снижается не только при действии глутаральдегида, но даже при длительной промывке в буферных растворах.

В отличие от капилляров, активность АЦ в интрамуральном нервном ганглии можно выявить и при более грубых воздействиях. Окраска в нервных волокнах обнаруживается даже через несколько дней и недель после хранения в буфере и даже фиксаторе. При этом она сохраняет чувствительность к действию медиаторов и других эффектов.

Исследования показали, что при кратковременной фиксации и различной длительности инкубации срезов в среде для выявления АЦ в течение 5—60 мин наблюдается следующая последовательность выявления структур, проявляющих активность АЦ. Через 5—15 мин инкубации слабое окрашивание обнаруживается в нервных элементах интрамурального ганглия. Оптимальное время для выявления этих структур — 20—25 мин. Через 25—30 мин инкубации начинается сла-

бое окрашивание капиллярной сети мозгового слоя и несколько позже коркового. Отчетливая реакция в капиллярах надпочечников у большинства животных отмечается через 60 мин инкубации.

Таким образом, после кратковременной фиксации активность АЦ в надпочечниках значительно выше, на что указывает обнаружение ее в капиллярах и заметное сокращение времени инкубации, необходимого для выявления фермента в интрамуральном ганглии. Это отмечается как в материале, инкубированном непосредственно после перфузии, так и в срезах, промытых после перфузии в буфере в течение ночи. Этот факт также свидетельствует об ингибирующем влиянии, оказываемом глютаральдегидом при его длительном воздействии на АЦ интрамурального ганглия надпочечника. Однако, как видно из вышеприведенных данных, АЦ интрамурального ганглия значительно устойчивее, чем АЦ капилляров надпочечника к действию факторов, связанных с гистохимическим выявлением АЦ.

Для выявления АЦ в интрамуральных ганглиях не имеет существенного значения качество глютаральдегида, а также скорость перфузии, тогда как при выявлении АЦ в кровеносном русле надпочечников предпочтительнее быстрая перфузия дистиллированным глютаральдегидом. АЦ нервных окончаний менее чувствительна не только к длительности фиксации и вышеуказанным факторам, но и к концентрации солей свинца, присутствующих в инкубационной среде и может выявляться при 4,8 ммоль азотнокислого свинца в довольно широком ряду значений рН от 6,4 до 8,4. При этом сохраняется чувствительность АЦ к норадреналину, особенно четко проявляющаяся при рН 8,4.

В отличие от результатов, полученных при использовании АТР, природного субстрата АЦ, способствующего выявлению реакции в интрамуральных ганглиях, применение синтезированного, но считающегося специфичным для АЦ субстрата—АИДФ, при обычных условиях выявления АЦ (после фиксации перфузией и дополнительной фиксации в течение 18—20 ч), не давало окрашивания волокон интрамурального ганглия. Окраска не проявлялась даже через 24 ч инкубации, реакция не обнаруживалась и после воздействия активаторов. Однако после кратковременной фиксации в глютаральдегиде применение АИДФ позволило выявить такую же картину, как с АТР, то есть реакция на АЦ выявлялась в нервных волокнах и сосудистой сети коркового и мозгового слоев надпочечника. Окрашивание обнаруживалось и в гранулярном компоненте железистых клеток (только при высоких значениях рН инкубационной среды — 8,4—8,9), что, очевидно, связано с проявлением реакции на АЦ в секреторных гранулах. В отличие от АТР, реакция с АИДФ развивается медленно. Начало выявления реакции на АЦ наблюдается лишь через несколько часов инкубации.

Выявлению АЦ в сосудистой системе надпочечника в наибольшей мере способствует фиксация 1%-ным параформальдегидом. Судя по полученным результатам, параформальдегид способствует большей сохранности ферментативной активности. АЦ в капиллярной сети выяв-

ляется даже после 20-часовой дополнительной постфиксации надпочечников, для выявления капилляров которых достаточно 10—20-минутная инкубация. Так же, как и после глотаральдегида, активность в мозговом слое выявляется раньше, чем в корковом.

Приведенные результаты гистохимического выявления АЦ в надпочечниках на светомикроскопическом уровне свидетельствуют о том, что определяемая биохимическими методами суммарная активность АЦ надпочечников, локализуется по крайней мере в трех различных структурных образованиях органа — гранулах, капиллярах и нервных элементах. Есть данные и об активности АЦ, проявляющейся в плазматических мембранах хромаффинных клеток [12]. Принимая во внимание функциональные различия секреторных клеток, составляющих эту сложную железу внутренней секреции, можно объяснить своеобразие реактивных ответов АЦ этих образований на действие медиаторов и других эффекторов. Так, было показано, что АЦ мембран хромаффинных гранул проявляет чувствительность к АХ и карбохолу [8, 9], тогда как АЦ плазматических мембран мозгового слоя нечувствительна к этим агентам [8]. Различия обнаружены и в отношении условий гистохимического выявления фермента, локализованного в различных структурных образованиях надпочечника. Они могут быть обусловлены составом фиксатора и характером его применения, составом инкубационной среды и использованных субстратов.

Своеобразие реакций, присущих АЦ различных структур, по-видимому, отражает специфическую роль системы АЦ—сАМР в проявлении процессов, характеризующих функциональное назначение этих структур. Так, исследованиями показано, что АЦ мембран хромаффинных гранул играет определенную роль в процессе секреции адреналина, на что указывало параллельное нарастание активности АЦ при высвобождении адреналина [10]. И, хотя биологическое значение этого параллелизма не совсем ясно, вопросы, связанные с выяснением механизмов действия системы АЦ—сАМР в мембранах хромаффинных гранул, заинтересованно обсуждаются в литературе [11—13, 14].

Что касается роли АЦ в интрамуральном нервном ганглии, то этот вопрос в литературе не обсуждался. Как было показано ранее, нервные волокна интрамурального ганглия, проявляющие четко выраженную реакцию на АЦ, преимущественно связаны с островками нор-адреналинпродуцирующих клеток и как бы объединяют их в единую систему [1, 6]. По всей вероятности, регуляция функций этих клеток в большей мере, чем адреналинпродуцирующих, зависит от нервных влияний, медируемых посредством системы АЦ—сАМР.

АЦ в провенозных капиллярах имеет определенное значение в процессе регуляции кровообращения и проницаемости капилляров. Сдвиги в химическом составе крови, притекающей к органу, могут служить сигналом для изменения активности АЦ, уровня сАМР и, как следствие, просвета капилляров и связанной с ним скоростью оттока продуктов секреторной деятельности надпочечников.

Выявленные различия в свойствах АЦ указанных структурных образований этой сложной железы, несомненно, свидетельствуют о возможности дифференцированной и тонкой регуляции функций различных компонентов надпочечника, обуславливающей его работу как целостного органа, обеспечивающего нормальное функционирование организма.

ADENYLATE CYCLASE OF MICROCIRCULATORY BED OF RAT ADRENALS

ROSTOMIAN M. A., ABRAMIAN K. S.,

H. Kh. Buniattan Institute of Biochemistry, Natl. Acad. Sci., of Rep. Armenia, Yerevan

The effect of histochemical procedures on the sensitivity of adenylyl cyclase (AC) of rat adrenals was studied. Variations with the contents of incubation media, time of fixation and composition of fixative allowed to show the existence of multiple pools of AC differed by their localization: in intramural ganglions, secretory granules and capillaries.

Different sensitivity of mentioned pools of AC is discussed in connection with the peculiarities of the regulation of this compound gland of inner secretion.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ростомян М. А., Абрамян К. С. Арх. анат: г. /6, № 1, с. 56—59, 1979.
2. Ростомян М. А., Гаспарян Э. И. Тез. II Всес. симп. «Циклазная система и ее роль в регуляции клеточного обмена», Ташкент, с. 55—56, 1978.
3. Камалян Р. Г., Ростомян М. А. Биол. журн. Армении, т. 35, № 10, с. 825—830, 1983.
4. Fihn F. M., Montibelled J. A., Ushiyama Y., Hoffman K. J. Biol. Chem., v. 250, p. 1186—1192, 1975.
5. Grahame-Smith D. G., Butcher R. W., Ney R. L., Sutherland E. W. J. Biol. Chem., v. 242, № 23, p. 5335—5346, 1967.
6. Ростомян М. А., Абрамян К. С. Нейрохимия, т. 4, № 3, с. 172—176, 1985.
7. Zinder O., Menard R., Lovenberg W., Pollard H. B. Biochem. Biophys. Res. Comm., v. 79, № 3, p. 707—712, 1977.
8. Guidotti A., Costa E. J. Pharm. Exptl. Ther., v. 189, № 3, p. 655—675, 1974.
9. Nikodievik O., Nikodievik B., Zinder O., Yu M.—W., Guroff G., Pollard H. B. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 73, p. 771—774, 1976.
10. Zinder O., Nikodievik O., Hoffman Ph. G., Pollard H. B. J. Biol. Chem., v. 251, № 7, p. 2179—2181, 1976.
11. Pollard H. B., Pazoles Ch. J., Creutz C. E., Zinder O. Int. Rev. of Cytology, v. 58, p. 159—197, 1979.
12. Wincler H., Carmichael S. W. The Secretory Granule. (eds. Poisner and Trifaro), Elsevier Biochemical Press, p. 3—79, 1982.
13. Wincler H., Westhead E. W. Neuroscience, v. 5, p. 1803—1923, 1980.
14. Zinder O., Pollard H. B. Proc. 4th Int. Catecholamine Symp., v. 1, p. 343—345, 1979.

Поступила 1. VII 1993