

УДК 616-018.82:616.447

К МЕХАНИЗМУ ДЕЙСТВИЯ ПАРАТИРЕОИДНОГО ГОРМОНА НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕРВНЫХ КЛЕТОК

Худавердян Д.Н., Тер-Маркосян А.С.,
Саргсян А.Р.

Ереванский государственный медицинский институт

Радиоиммунным методом, модифицированным нами, изучен процесс связывания паратиреоидного гормона (ПТГ) с синапсосомами коры головного мозга крыс и ганглиями улитки *Helix* в условиях *in vitro*. Установлено, что синапсосомы в присутствии эффективных доз (тест на транспорт Ca^{2+}) в инкубационной среде способны связать $279,62 \pm 43,92$ пг/мг белка ПТГ. У ганглиев эта способность ниже и составляет $49,67 \pm 4,22$ пг/мг белка. Обнаружен эффект «down»-регуляции ПТГ в ганглиях. Определено содержание ПТГ, общего и ионизированного кальция, ионизированного калия и натрия в крови и СМЖ животных.

* * *

По классическим представлениям, органами-мишенями ПТГ являются кости, почки и кишечник. Однако в последние годы все больше появляется данных об участии околотитовидных желез в регуляции функциональной активности ЦНС [1—3], гипоталамо-гипофизарно-надпочечникового комплекса [4], сердечно-сосудистой системы [5,6]. В основе действия ПТГ на клетки, не являющиеся для него мишенью, лежит его способность активировать поступление Ca^{2+} -вторичного внутриклеточного посредника, запускающего, подобно циклическим нуклеотидам, каскад ферментативных реакций, ведущий к изменению функционального состояния клетки. Предполагается [6], что для осуществления эффекта на миоциты ПТГ комплексируется с белками примембранного слоя. При этом косвенно указывается на изменение содержания cAMP в миоцитах.

В предыдущих наших исследованиях [7,8] был выявлен феномен активации входа Ca^{2+} в синапсосомы коры мозга крыс физиологическими дозами ПТГ (10^{-11} — 10^{-9} М). Чтобы определить, возможна ли паратиреоидная регуляция функциональной активности нервной клетки, необходимо выяснить наличие ПТГ в СМЖ и пределы колебания его содержания. Учитывая способность ПТГ регулировать минеральный обмен, важно исследовать содержание общего, ионизированного кальция, а также ионизированного калия и натрия в крови и СМЖ и выяснение корреляции между этими показателями. В то же время для объяснения механизма действия

ПТГ на нервную ткань представляется интересным изучение хеморецептивных свойств мембран синапсом коры мозга крыс и ганглиев, что дает возможность сравнить хеморецептивную способность мембран нервной клетки к ПТГ в эволюционном аспекте.

Материалы и методы

Объектом исследования служили белые беспородные крысы-самцы массой 160—180 г, кролики массой 2,5—3 кг и улитки *Helix*.

СМЖ и сыворотку крови получали у кроликов. Содержание общего кальция в сыворотке крови и СМЖ определяли спектрофотометрически с использованием набора «Chemapol» (ЧССР), а ионизированного кальция, калия и натрия—на приборе «Microlith» («Cone», Финляндия). Содержание ПТГ определяли радиоиммунным методом при помощи набора фирмы «Oris» (Франция).

Синапсомы выделяли из коры головного мозга крыс методом Najos [9]. Исследование процесса связывания ПТГ с мембраной синапсом проводили радиоизотопным методом с применением набора фирмы «Oris» (Франция), предназначенного для радиоиммунного определения содержания ПТГ в крови. Принцип метода заключается в конкурентном связывании меченого (^{125}I -ПТГ) и немеченого определяемого гормона (в зависимости от концентрации) с антителами гормона. Для решения поставленной перед нами задачи методика исследования была несколько модифицирована. В данном случае в качестве антител для ПТГ служили возможные белки-рецепторы на мембране, и метод основывался на конкурентном связывании меченого гормона и гормона, находящегося в среде инкубации. Синапсомы в количестве 250 мкг белка/мл инкубировали в среде, содержащей (в мМ): NaCl —145, KCl —5, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ —1,5, MgCl_2 —1,3, CaCl_2 —0,02, глюкозу—10, трис- HCl —20, pH 7,4 при 37°. ПТГ в виде паратиреоидной субстанции («Sigma», США) добавляли в среду инкубации в концентрации 10^{-9} М. При этой концентрации наблюдается максимальный эффект влияния ПТГ на вход Ca^{2+} в синапсомы [7,8]. Меченый гормон набора (разбавленный в 5 раз вместо 100 по методике) добавляли в среду инкубации в количестве 0,1 мл на 1 мл среды инкубации. Параллельно ставили контрольные пробы, в которых синапсомы инкубировали только с изотопом. После инкубации (20 мин) пробы переносили на фильтры «Synpro» (ЧССР, N10) и трижды промывали 3 мл среды инкубации, содержащей $2 \cdot 10^{-9}$ М ПТГ. Радиоактивность фильтров измеряли на счетчике Gamma Comp-1190 (Канада). Рассчитывали отношение результатов опытных проб к контрольным, выражали в процентах и дальнейший расчет проводили по калибровочной кривой. Калибровку проводили при помощи стандартных растворов, находящихся в наборе, используя при этом те же концентрации ^{125}I -ПТГ, что и в опыте.

Исследование связывания ПТГ с ганглиями проводили аналогичным способом. Инкубационная среда для ганглиев содержала (в мМ): NaCl—85, KCl—4, CaCl₂—7, MgCl₂—14, глюкозу—10, трис-HCl—10, pH 7,6 при 18°. В этой серии экспериментов был использован ПТГ в концентрации 10⁻¹⁰ М и 10⁻⁸ М, что также было обусловлено результатами наших предыдущих исследований [10] по изучению действия ПТГ на Ca²⁺-аккумулирующую способность ганглиев. После соответствующей инкубации ганглии промывали трижды в 3-кратном объеме среды инкубации, содержащей 2·10⁻¹⁰ или 2·10⁻⁸ М ПТГ в зависимости от его исходной концентрации в окружающей ганглии среде.

Количество связанного ПТГ с синапсосомами и ганглиями выражали в пг/мг белка. Содержание белка в пробах определяли по Lowry и соавт. [11].

Результаты и обсуждение

Результаты по определению содержания ПТГ, общего кальция, Ca²⁺, K⁺ и Na⁺ в сыворотке крови и СМЖ приводятся в табл.1, из которой следует, что в СМЖ ПТГ определяется, хотя и составляет 1/3 гормона, содержащегося в крови. Общий кальций и K⁺ также превышают уровень соответствующих элементов в СМЖ, в то время как концентрация Ca²⁺ и Na⁺ в обеих биологических жидкостях одинакова. На основании обнаруженного нами факта наличия ПТГ в СМЖ можно предположить, что он участвует в регуляции функциональной активности ЦНС, и не исключено, что эта регуляция осуществляется путем изменения содержания Ca²⁺ на уровне нервной клетки.

Таблица 1

Содержание паратиреоидного гормона (ПТГ: в нг/мл), общего кальция, Ca²⁺, K⁺, Na⁺ (в мМ) в сыворотке крови и СМЖ кроликов

Объект исследования	ПТГ	Общий кальций	Ca ²⁺	K ⁺	Na ⁺
Кровь n=3	1,60±0,20	3,53±0,13	1,15±0,10	4,89±0,23	142,47±1,46
СМЖ n=3	0,47±0,16 t=4,13	1,90±0,19 t=7,00	1,16±0,05 t=0,09	2,94±0,20 t=6,50	143,77±5,62 t=0,22

Результаты исследования хеморецептивных свойств нейрональной мембраны к ПТГ обобщены в табл.2, из которой видно, что при наличии в среде инкубации 10⁻⁹ М ПТГ синапсосомы способны связать 279,62±43,92 пг/мг белка гормона.

В серии экспериментов, проведенных на ганглиях, были использованы

две различные концентрации гормона: 10^{-10} и 10^{-8} М, что, как уже отмечалось, обосновано нашими данными относительно Ca^{2+} -аккумулирующей способности ганглиев под действием указанных концентраций ПТГ [10]. Максимальные сдвиги в содержании Ca^{2+} в ганглиях во временном интервале 0—0,5 мин были вызваны ПТГ в концентрации 10^{-10} М. Тот факт, что максимум изменений наблюдается именно в таком маленьком промежутке времени от начала инкубации ганглиев с ПТГ и $^{45}\text{Ca}^{2+}$, свидетельствует, по-видимому, об активации потенциалзависимого Ca^{2+} -канала мембраны. ПТГ в концентрации 10^{-8} М в этом промежутке времени не оказывал существенного действия и лишь спустя 15—30 мин инкубации приводил к стимуляции транспорта $^{45}\text{Ca}^{2+}$ в ганглии. Результаты данной серии экспериментов показывают, что в случае присутствия в инкубационной среде 10^{-10} М ПТГ ганглиями связывается $49,67 \pm 4,22$ пг/мг белка гормона. Хеморецептивные свойства ганглиев резко подавляются, если концентрация ПТГ увеличивается до 10^{-8} М и составляет $0,69 \pm 0,08$ пг/мг белка.

Таблица 2

Хеморецептивная способность синапсом коры головного мозга крыс и ганглиев улитки *Helix* к паратиреоидному гормону (ПТГ; в пг/мг белка)

Объект исследования	Концентрация ПТГ. М		
	10^{-10}	10^{-8}	10^{-6}
Синапсомы n=5	—	$279,62 \pm 43,92$	—
Ганглии n=5	$49,67 \pm 4,22$	—	$0,69 \pm 0,08$

Таким образом, с повышением концентрации гормона степень его связывания с ганглиями уменьшается. По данным литературы [12], большие дозы ПТГ уменьшают число рецепторов в плазматических мембранах органов-мишеней, в частности почек, то есть имеет место ауторегуляторный феномен, называемый «down»-регуляция. Можно предположить, что обнаруженный нами факт есть следствие вышеописанного ауторегуляторного феномена.

Сравнивая количества связанного гормона с мембраной синапсом и ганглиями, можно заметить, что хеморецептивная способность синапсом к ПТГ намного выше, чем у ганглиев. Это, по-видимому, объясняется наличием околотитовидных желез и соответствующих специфических рецепторов к ПТГ у крыс. У улиток эти рецепторы менее чувствительны к гормону. Несмотря на это, эффект действия ПТГ на вход Ca^{2+} в ганглии больше (54,70%) [10], чем в синапсомы (31,74%) [7,8], что указывает на возможность действия ПТГ на мембрану нервной клетки не только по классическому механизму, присущему пептидным гормонам, но и в результате воздействия непосредственно на структурную целостность мембраны,

например, путем активации различных фосфолипаз (A_1, A_2, C), приводящих в конечном итоге к повышению внутриклеточного Ca^{2+} . В пользу этого предположения свидетельствуют данные литературы [13] о возможной активации ПТГ фосфолипазы A_2 в мембранах митохондрий, приводящей к разобщению окислительного фосфорилирования. Как известно, в плане регуляции кальциевого метаболизма на клеточном уровне наибольший интерес представляет фосфолипаза C , являющаяся регулятором фосфоинозитольного цикла [14].

Таким образом, мембрана нервной клетки способна связывать ПТГ. На такую возможность указывают также предположения некоторых авторов [15,16] о существовании рецепторов для ПТГ на мембране нервной клетки. Вышеизложенное дает основание рассматривать нервную ткань в качестве мишени для ПТГ и соответственно пересмотреть круг тканей, рецептирующих ПТГ.

ON THE MECHANISM OF PARATHYROID HORMONE EFFECT ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF NERVE CELLS

Khudaverdyan D. N., Ter-Marcosyan A. S.,
Sargsyan A. R.

State Medical Institute, Yerevan

Binding of parathyroid hormone (PTH) with rat cerebral cortex synaptosomes and *Helix pomatia* ganglia was studied *in vitro* by a modified radioimmunological technique. In the presence of effective doses of PTH in the reaction medium (Ca^{2+} transport test) synaptosomes bound 279.62 ± 43.92 pg PTH per milligram of synaptosomal protein. The binding capacity of ganglia was lower (49.67 ± 4.22 pg/mg). «Down»-regulation by PTH was observed in ganglia. We also determined concentrations of PTH, total and ionized calcium, ionized potassium and sodium in blood and cerebrospinal fluid of animals.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Худавердян Д.Н. Докт. дисс., Ереван, 1984.
2. Худавердян Д.Н., Мхехян Э.Э.-В кн.: II Всесоюзный съезд эндокринологов, с.330—331, Л., 1980.
3. Школовой В.В., Глебов Р.Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., N12, с.1434—1436, 1976.
4. Довлатян Р.А. Канд. дисс., Тбилиси, 1986.
5. Strickland M.L., Moore P.L., Pang P.K.T., Crass M.F. J. Comp. Physiol., B147, s.101—106 1982.
6. Барабанова В.В. Автореф. докт. дисс., Л., 1981.
7. Худавердян Д.Н., Крыжановский Г.Н., Тер-Маркосян А.С., Луценко В.К. Тезисы докл. II Конференции по физико-химической биологии и биотехнологии в медицине, с.61, Ереван, 1986.

8. Луценко Б.К., Тер-Маркосян А.С., Хлебникова Н.Н., Худавердян Д.Н. Бюл. эксперим. биол. и мед., N8, с.146—149, 1987.
9. Hajos F. Brain Res., v.93, p.485—489, 1975.
10. 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.
11. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. J. Biol. Chem., v.193, N1, p.265 - 275, 1951.
12. Forte L.K., Langelutting S.G., Poelling R.E., Thomas M.L. Amer. J. Physiol., v.242, N3, p.485—489, 1975.
13. Сороковой В.И., Владимиров Ю.А. - В кн.: Итоги науки и техники. Сер. Биофизика (под ред. Ю.А.Владимирова), т.5, с.12—55, М., ВИНТИ, 1975.
14. Beride M.J., Dawson R.M.C., Downes C.P. Biochem. J., v.212, N2, p.473—482, 1983.
15. Држевецкая И.А., Држевецкий Ю.М. Гормональная регуляция обмена кальция и секреторные процессы. Итоги науки и техники. Сер. Физиология человека и животных, т.27, М., 1983.
16. Држевецкая И.А. Эндокринная система растущего организма, М., Высшая школа, 1987.

Поступила 12. 09. 1988

A. Gorio, J.R. Perez-Polo, J. De Vellis, B. Haber Neural Development and Regeneration. Cellular and Molecular Aspects. (NATO ASI Series, v.H.22), Springer, Berlin, 711 p., 1988.

Развитие и регенерация нервов. Клеточные и молекулярные аспекты.

В этом томе представлены данные о соответствующих аспектах роста и дифференциации нервных клеток. Регуляция экспрессии, хранения и высвобождения факторов роста нервов, регуляция рецепторов и клеточные реакции на факторы роста — таков перечень обсуждаемых в книге проблем. Уделено также внимание влиянию различных нейротрансмиттеров на морфогенез нервов и новым результатам о взаимодействии клеток и медиаторов иммунной, эндокринной и нервной систем. Подробно рассмотрены факторы, регулирующие регенерацию и распространение нервов после повреждения нервной ткани.