



УДК 612.822.1

ВЛИЯНИЕ КАРДИОАКТИВНЫХ НЕЙРОГОРМОНОВ «Г» И «К»
НА ВЫСВОБОЖДЕНИЕ И ЗАХВАТ $[^3\text{H}]$ НОРАДРЕНАЛИНА
В СИНАПТОСОМАХ ГИПОТАЛАМУСААРМЕНЯН А. Р., ДРАКЕЛЯН Л. Н., СРАПИОНЯН Р. М.,
КАРАПЕТЯН Р. О., СААКЯН Ф. М., СААКЯН С. А., ГАЛОЯН А. А.

Институт биохимии АН АрмССР, Ереван

Изучено влияние нейрогормонов «Г» и «К» на K^+ -вызванное высвобождение и захват $[^3\text{H}]$ норадреналина ($[^3\text{H}]\text{НА}$) в гипоталамических синапсосомах мозга крыс. Нейрогормон «Г» (нГ) в концентрации 25 мЕ/мл, добавленный одновременно с K^+ , подавлял K^+ -вызванное высвобождение $[^3\text{H}]\text{НА}$, тогда как в концентрации 50 мЕ/мл—стимулировал этот процесс. Когда нГ в концентрации 50 мЕ/мл добавляли к суперфузионной среде до стимуляции синапсосом, а затем вместе с K^+ , то усиления вызванного высвобождения $[^3\text{H}]\text{НА}$ больше не наблюдалось. В присутствии нГ в концентрациях 5 и 100 мЕ/мл вызванное высвобождение $[^3\text{H}]\text{НА}$ не изменялось. В концентрациях 20 и 50 мЕ/мл нГ увеличивал специфический захват $[^3\text{H}]\text{НА}$ синапсосомами. Нейрогормон «К» (нК) в концентрации 0,05 Бд^{*}/мл стимулировал K^+ -вызванное высвобождение $[^3\text{H}]\text{НА}$. В присутствии нК (0,01—0,1 Бд/мл) захват $[^3\text{H}]\text{НА}$ синапсосомами не изменялся. Полученные результаты говорят о возможном участии нГ и нК в процессе пресинаптической регуляции высвобождения НА в гипоталамической области мозга.

Установлено, что в нейросекреторных гранулах магноцеллюлярных ядер гипоталамуса ряда животных вырабатываются пептидные нейрогормоны, оказывающие регулирующее влияние на сердечную деятельность. Условно их назвали нейрогормоны «Г», «К» и «С» [1, 2]. Выяснено, что эти вещества, поступая из мозга в общую циркуляцию, связываются с γ -глобулинами сыворотки крови и транспортируются к сердцу [3]. Далее из гипоталамуса и нейрогипофиза ряда животных выделены коронароактивные белки—предшественники и носители нГ, нК и нС [4]. Изучение субклеточного распределения этих нейроспецифических белков выявило их локализацию в нейросекреторных гранулах и синапсосомах гипоталамуса и коры мозга [5]. Из этих нейрогормонов наиболее подробно изучен нС, который оказался активным регулятором различных метаболических процессов в мозгу и висцеральных органах [6]. В настоящее время нГ и нК сравнительно мало

* Бд—биологическая доза

изучены. Выявлено, что нГ, подобно нС, ингибирует активность фосфо-диэстеразы (ФДЭ) сАМР в мозгу и увеличивает фосфорилазную активность в мозгу, скелетной мышце и почках. В отношении нК доказано, что он не действует на ФДЭ сАМР [7].

Синаптосомная локализация нейрогормонов предполагает их участие в синаптических процессах, в частности, в регуляции обмена нейромедиаторов. Исходя из этого, в настоящей работе мы изучали влияние нГ и нК на захват и K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]$ НА в гипоталамических синаптосомах.

Материалы и методы

Нервные окончания из гипоталамической области мозга крыс, выделенные по методу Hajos [8], инкубировали 10 мин в присутствии $[^3H]$ НА ($5 \cdot 10^{-8}$ М). Затем синаптосомную суспензию переносили в суперфузионные камеры на мембранные миллипоровые фильтры (диаметр пор 0,65 мкм, тип ДА). Высвобождение $[^3H]$ НА из синаптосом изучали суперфузионным методом Raiteri и соавт. [9]. Скорость супер-

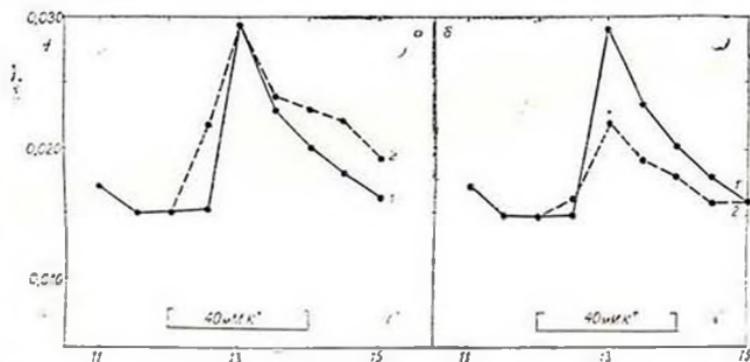


Рис. 1. Влияние 5 мЕ/мл (а) и 25 мЕ/мл (б) нейрогормона «Г» на K^+ -вызванное высвобождение 3H -норадреналина из гипоталамических синаптосом. По оси абсцисс—время суперфузии в мин; по оси ординат—степень высвобождения 3H -норадреналина. 1—контроль, 2—нейрогормон «Г». Средние данные 5–8 опытов; стандартное отклонение не более 10%; * $p < 0,005$

фузии составляла 1 мл/мин. Степень высвобождения $[^3H]$ НА (i) рассчитывали по отношению радиоактивности суперфузионной среды к оставшейся общей радиоактивности синаптосом. При изучении захвата инкубированную суспензию ($0,77 \pm 0,07$ мг белка/мл) в присутствии $[^3H]$ НА и нейрогормонов переносили на миллипоровые фильтры и промывали. Для вычитания неспецифического захвата проводили параллельную инкубацию синаптосом при 0°. Радиоактивность синаптосом и среды измеряли после добавления 0,5 мл этанола и 10 мл сцинтилляционной жидкости Брея на жидкостном сцинтилляционном счетчике «Intertechnique SL-4221» (Франция). Подробности методики исследования описаны в предыдущей работе [10].

Использовали Krebs-бикарбонатный буфер pH 7.2—7.4 со следующим составом (мМ): NaCl—113; KCl—4,75; KH_2PO_4 —1,2; MgSO_4 —1,2; NaHCO_3 —25; CaCl_2 —2,5; глюкоза—11,5. В буфер добавляли ипразид ($6,10^{-4}$ М), аскорбиновую кислоту ($1,14 \cdot 10^{-3}$ М) для предотвращения распада НА. В K^+ -обогащенной среде (40 мМ) изотоничность среды достигалась изомолярным замещением NaCl на KCl.

Использовали [^3H]НА (35 $\text{K}_\mu/\text{мМ}$) фирмы «Amersham». Белок определяли по методу Lowry и соавт. [11].

Препараты кардиоактивных нейрогормонов выделены из состава низкомолекулярных соединений уксуснокислого экстракта обезжиренной гипоталамической ткани. Препараты очищали по разработанной схеме, включающей ИОХ на ДЭАЭ-ц, гель-фильтрацию через сефадекс G-25, распределительную хроматографию на бумаге FN-11 в системе растворителей бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5) и повторную гель-фильтрацию через глицинамидированный сефадекс [12].

За единицу активности (Е) иГ принимали количество препарата, которое ингибирует 1 миллиединицу ФДЭ САМР гомогената мозга крысы за 1 мин. За одну биологическую дозу иК принимали такое количество препарата, которое увеличивает объем крови, оттекающей из венозных сосудов сердца, на 100%.

Результаты и обсуждение

Влияние иГ на K^+ -вызванное высвобождение и специфический захват [^3H]НА в гипоталамических синапсах. Гипоталамические синапсы, инкубированные в присутствии [^3H]НА, промывали буфером и на 12-ой мин суперфузии добавляли K^+ -обогащенную среду, при котором выход [^3H]НА из синапсом усиливался на 93%. Затем к синапсам одновременно с K^+ добавляли иГ в концентрациях 5, 25, 50 и 100 мЕ/мл. Результаты исследований показали, что иГ в концентрации 5 мЕ/мл не изменяет K^+ -вызванное высвобождение [^3H]НА из синапсом, но после стимуляции при промывании синапсом буфером возвращение высвобождения [^3H]НА к его спонтанному уровню происходит медленно (рис. 1, а). Когда к синапсам вместе с K^+ добавляли иГ в концентрации 25 мЕ/мл, вызванное высвобождение [^3H]НА из синапсом значительно подавлялось и составляло 47% (рис. 1, б).

Дальнейшее увеличение концентрации иГ в 2 раза (50 мЕ/мл) привело к обратному эффекту—усилению K^+ -вызванного высвобождения [^3H]НА. Примечательно, что при промывании синапсом буфером после стимуляции в присутствии 50 мЕ/мл иГ высвобождение [^3H]НА из синапсом вновь усиливалось, достигая уровня максимального усиления (рис. 2, а, 2). В следующей серии опытов, когда иГ в концентрации 50 мЕ/мл добавляли до стимуляции синапсом, а затем со стимуляцией, спонтанное высвобождение [^3H]НА не изменялось, но усиления K^+ -вызванного высвобождения больше не наблюдалось (рис. 2, а, 3).

Большие концентрации нГ (100 мЕ/мл) не вызывали статистически достоверных изменений K^+ -вызванного высвобождения $[^3H]HA$ из синапсом (рис. 2, б).

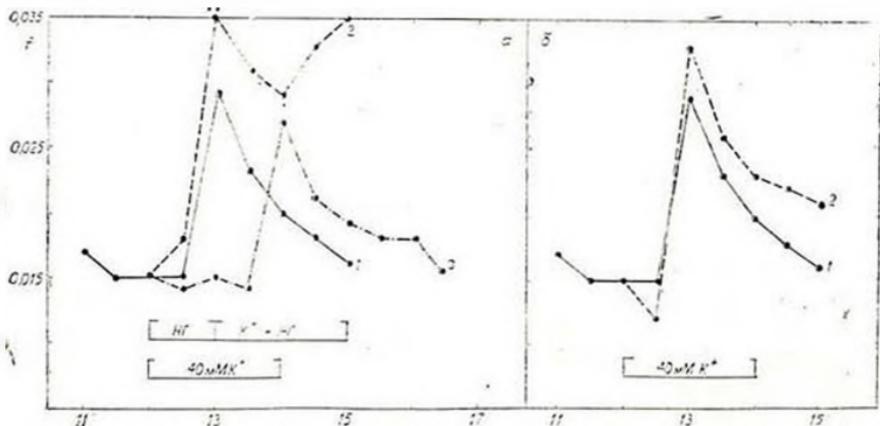


Рис. 2. Влияние 50 мЕ/мл (а) и 100 мЕ/мл (б) нейрогомона «Г» на K^+ -вызванное высвобождение 3H -норадреналина из гипоталамических синапсом. 1—контроль. 2—нейрогомон «Г» добавлен вместе с K^+ . 3—нейрогомон «Г» добавлен до и вместе с K^+ . Средние данные 4—7 опытов; стандартное отклонение не более 10%; Обозначения те же, что и на рис. 1; $^{**}p < 0,01$

При изучении влияния нГ на специфический захват $[^3H]HA$ гипоталамическими синапсом применяли его в концентрациях 5: 10: 20: 50 и 100 мЕ/мл. Как видно из таблицы, захват $[^3H]HA$ в присутствии нГ увеличивается, однако статистически достоверное увеличение наблюдалось при применении 20 и 50 мЕ/мл нГ, что составляло 39 и 37% соответственно.

Влияние нК на K^+ -вызванное высвобождение и специфический захват $[^3H]HA$ в гипоталамических синапсом. Стимуляцию гипоталамических синапсом, предварительно инкубированных с $[^3H]HA$, проводили в присутствии 0,01: 0,025: 0,05: 0,1 Бд/мл нК. Как показали исследования, только в концентрации 0,05 Бд/мл нК стимулировал K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]HA$ из синапсом (53%), остальные использованные нами дозы нК не вызвали статистически достоверных изменений этого процесса (рис. 3).

В вышеупомянутых концентрациях нК не изменял процесса специфического захвата $[^3H]HA$ гипоталамическими синапсом (таблица).

Таким образом, полученные нами результаты указывают на то, что нК стимулирует, а нГ, в зависимости от концентрации, подавляет или усиливает K^+ -вызванное высвобождение $[^3H]HA$ из гипоталамических синапсом. Однако не известно, каким механизмом осуществляется их действие на высвобождение HA .

Как уже отмечали, нК не действует, а нГ ингибирует активность

ФДЭ сАМР в мозгу. Но отсутствуют данные об их действии на активность аденилатциклазы, которые помогли бы в интерпретации полученных нами данных. Предполагается, что активация пресинаптических α -адренорецепторов влияет на вызванное деполяризацией высвобождение

Таблица

Влияние нейрого르몬ов «Г» и «К» на захват $[^3\text{H}]$ норадреналина (пмоль/мг белка) гипоталамическими синапсосомами

Контроль		1,32±0,18 (4)	Контроль		1,95±0,17 (5)
Нейрого르몬 «Г»	5 мЕ/мл	1,64±0,07 (8)	Нейрого르몬 «К»	0,01 Бд/мл	1,91±0,10 (6)
	10 мЕ/мл	1,56±0,07 (6)		0,025 Бд/мл	2,08±0,16 (5)
	20 мЕ/мл	1,84±0,07 $p < 0,05$ (7)		0,05 Бд/мл	1,76±0,14 (7)
	50 мЕ/мл	1,82±0,07 $p < 0,05$ (8)		0,1 Бд/мл	1,70±0,06 (6)
	100 мЕ/мл	1,31±0,06 (9)		—	—

Примечание. В скобках указано число опытов.

НА посредством ингибирования аденилатциклазной системы, а активация β -адренорецепторов модулирует этот процесс посредством стимуляции аденилатциклазной системы [13—15]. Возможно, что в зависимости от концентрации нГ может ингибировать или стимулировать активность аденилатциклазы и выступать в роли агониста α - или β -адренорецеп-

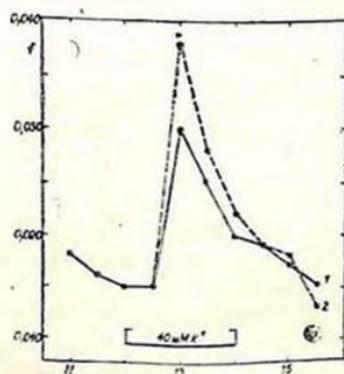


Рис. 3. Влияние нейрого르몬а «К» (0,05 Бд/мл) на K^+ -вызванное высвобождение $[^3\text{H}]$ норадреналина из гипоталамических синапсосом: 1—контроль, 2—нейрого르몬 «К». Средние данные 6—8 опытов; стандартное отклонение не более 10%; обозначения те же, что и на рис. 1.

торов. Отсутствие стимулирующего действия 50 мЕ/мл нГ при его длительном применении (до и вместе с K^+ , по всей вероятности, можно объяснить увеличением его концентраций в норадренергических окончаниях, а большие дозы нГ, как было показано, не оказывают действия на K^+ -вызванное высвобождение $[^3\text{H}]$ НА (рис. 3).

Наши исследования показали, что нК не влияет, а нГ в концентрации 20 и 50 мЕ/мл увеличивает захват $[^3\text{H}]$ НА гипоталамическими синапсосомами, несмотря на то, что эти концентрации оказывают разно-

направленное действие на вызванное высвобождение [^3H]НА. Полученные результаты свидетельствуют об участии исследуемых нейрогормонов в пресинаптической регуляции высвобождения НА в гипоталамусе.

EFFECT OF CARDIOACTIVE NEUROHORMONES „G“ AND „K“ ON THE RELEASE AND UPTAKE OF ^3H -NORADRENALINE IN HYPOTHALAMIC SYNAPTOSOMES

ARMENIAN A. R., ARAKELIAN L. N., SRAPIONIAN R. M., KARAPETIAN R. H., SAHAKIAN F. M., SAHAKIAN S. A., GALOYAN A. A.

Institute of Biochemistry, ArmSSR Acad. Sci., Yerevan

Effect of neurohormones „G“ and „K“ on the K^+ -evoked release and uptake of ^3H -noradrenaline (^3H -NA) in rat hypothalamic synaptosomes has been studied. In the presence of 25 I./Uml of neurohormone „G“ (added during stimulation) the K^+ -evoked (40 mM) release of ^3H -NA from synaptosomes reduced, being enhanced by 50 I./Uml of neurohormone „G“. The activatory effect of neurohormone „G“ was not observed when it is added before and during stimulation of synaptosomes. In the presence of 5 and 100 I./Uml of neurohormone „G“ the K^+ -evoked release of ^3H -NA was not altered. Neurohormone „G“ (20 and 50 I./U ml) enhanced the uptake of ^3H -NA by synaptosomes. Neurohormone „K“ (0.5 biol. dose/ml) increased K^+ -evoked release of ^3H -NA, but in 0,01–0,1 biol. dose/ml it exerted no effect on the uptake of ^3H -NA. Data obtained indicate that neurohormones may be involved in the presynaptic regulation of NA release in hypothalamus.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галоян А. А. Докл. АН АрмССР, т. 34, с. 109–111, 1962.
2. Галоян А. А., Саакян Ф. М. Докл. АН АрмССР, т. 201, с. 483–485, 1971.
3. Галоян А. А., Оганян М. В., Геворкян Г. Г. Докл. АН АрмССР, т. 54, с. 255, 1971.
4. Галоян А. А., Срапионян Р. М. Докл. АН АрмССР, т. 42, с. 210–213, 1966.
5. Srapionian R. M., Sahakian F. M., Galoyan A. A. Neurochemical Research, v. 6, p. 1299–1307, 1981.
6. Галоян А. А. Вopr. биохимии мозга, т. 13, с. 9–38, 1978.
7. Срапионян Р. М., Арменян А. Р., Карапетян Р. О., Саакян Ф. М., Саакян С. А., Аракелян Л. Н., Галоян А. А. Тезисы докл. Международного симпозиума нейроэндокринологии, с. 129, Ленинград, 1935.
8. Hajos F. Brain Res., v. 93, p. 485–489, 1975.
9. Raiteri M., Angelini F., Levi G. Eur. J. Pharmacol., v. 25, p. 411–414, 1974.
10. Арменян А. Р., Чифлякян М. Д., Бунятыян Г. X. Вopr. биохимии мозга, т. 14, с. 135–142, 1980.
11. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., v. 193, p. 265–275, 1951.
12. Галоян А. А., Срапионян Р. М., Карапетян Р. О., Саакян С. А. Докл. АН АрмССР, т. 67, с. 176–179, 1978.
13. Rodball M. Nature, v. 254, p. 17–22, 1980.
14. Werner J., Schoffelemer A. N. M., Mulder A. H. J. Neurochem., v. 39, p. 349–356, 1982.
15. Fain J. N., Garcia-Sanz J. A. Life Sci., v. 26, p. 1183–1194, 1950.

Поступила 17. IX 1986