

УДК 577.17

М. Ш. Мурадян

**Влияние нейрогормона "С" на захват [³⁵S] таурина
в изолированных органах крыс при блокаде рецепторов**

(Представлено академиком НАН Армении А.А.Галояном 10/IX 1998)

Показано, что коронарорасширяющий нейрогормон "С", выделенный из гипоталамуса крупного рогатого скота, является специфическим регулятором сердечного кровообращения без изменения кровяного давления (1,2). НС* является уникальным внутриклеточным ингибитором Ca^{2+} – калмодулин зависимой (ФДЭ) 3',5' цАМФ мозга и сердца (3,4). НС в концентрациях 10^{-9} – 10^{-12} М в несколько раз (10–20) усиливает биосинтез дофамина и норадреналина в срезах гипоталамуса и стриатума (5). НС является регулятором ионов Ca^{2+} , стимулируя выход кальция (подобно IP_3) из саркоплазматического ретикулума в саркоплазму, а из саркоплазмы во внеклеточное пространство (6).

Этот сложный гликопептид одинаково увеличивает чувствительность гладкой мускулатуры кишечника как в отношении норадреналина, так и ацетилхолина (7,8). В сокращении и релаксации гладкой и сердечной мышцы принимает участие эндогенная серусодержащая нейромедиаторная аминокислота – таурин (9,10). Известно, что под влиянием таурина увеличивается проницаемость мембран для Ca^{+} в миокарде (11,12).

В литературе имеются данные о том, что таурин может включаться в некоторые воспроизводительные и эндокринные функции организма (13,14). Предполагается, что таурин является неспецифическим регулятором чувствительности миокардиальных клеток к биологически активным веществам (15).

В предыдущих наших исследованиях (16), как и в работах других авторов (17,18) было показано, что интенсивность захвата таурина в разных частях организма разная.

* Принятые сокращения: НС – нейрогормон "С", ПП – пропранолол, ФА – фетоламин, КОК – кокаин, НА – налоксон, НТ – налтрексон, АМ – амизил, АТ – атропин, ТК – тонкая кишка, СВП – семявыносящий проток, НА – надпочечники, СКМ – скелетная мускулатура.

Одной из важнейших задач современной нейробиологии, и в частности нейрехимии, является исследование особенностей процесса захвата нейромедиаторных аминокислот, его взаимодействия с соответствующими рецепторами. Поскольку и таурин, и НС изменяют реакцию гладкой мускулатуры на ацетилхолин и адреналин (7,19,20), можно предположить, что оба они оказывают влияние на соответствующие рецепторы клетки и взаимоотношение таурина и НС происходит на уровне их рецепторов.

Основным доказательством существования захвата нейромедиатора является повышение их содержания в синаптических нервных окончаниях (нейрональный захват), в везикулах (везикулярный захват) или в экстранейрональных участках тканей. О захвате можно судить также по уменьшению количества в инкубируемой среде.

Установлено, что через адренорецепторы может осуществляться регуляция некоторых процессов, происходящих в пресинаптическом звене.

В свете вышесказанного представляет интерес изучение взаимодействия НС и таурина в изолированных органах крыс при блокировании рецепторов.

Цель настоящей работы – изучить влияние НС на захват таурина гладкой мускулатуры, тонкой кишки, семявыносящего протока, а также скелетной мускулатуры и надпочечника при блокировании холино-, адрено- и опиоидных рецепторов.

Опыты проводили на белых крысах-самцах и самках породы Вестер массой 180-200 г. Крыс оглушали электрическим током и декапировали. Навески срезов ТК, СВП, СКМ, НА инкубировали в растворе Тироде (в мМ): NaCl – 153,9, KCl – 41,5, CaCl₂ – 2,5, MgCl₂ – 1,0, NaHCO₃ – 11,9, NaH₂PO₄ – 1,0, глюкозы – 5,5, аскорбиновой кислоты – 2,8. Инкубацию проводили в течение 30 мин в камере объемом 10 мл при 37°C, насыщенной кислородом. Затем заменяли этот раствор и проводили преинкубацию ингибиторами адрено-, холино- и опиоидных рецепторов в течение 20 мин. После чего срезы по 30 мин инкубировали в свежем растворе Тироде в присутствии НС (0,2 МЕ ФДЭ) и [³⁵S] таурина в концентрации 0,02 мк кюри/мл (3·10⁻⁹ М). По окончании инкубации проводили пятикратную промывку препаратов раствором Тироде, затем препараты помещали в сцинтилляционные кюветы, заливали 1 мл этилового спирта и оставляли на 16-18 ч, после чего добавляли в кюветы 10 мл сцинтилляционной жидкости, содержащей 4 г ППО (2,5 дифенилоксазол) и 100 мг ПОПОП (1,4, ди-5фенил-2-оксазол) на 1 мл толуола (21). Радиоактивность измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике "Интертекник" СЛ-30 (Франция) с внешним стандартом, что позволило выразить захват [³⁵S] таурина в распадах 1 мин на 1 г ткани. В опытах был использован [³⁵S] таурин фирмы "Амершам" с удельной активностью 8,2 кю-

ри/ммоль. Обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики Фишер-Стьюдента. Инкубационная среда содержала $[^{35}\text{S}]$ таурина (10^{-9} М) и немеченую аминокислоту таурина в концентрации 10^{-5} М. Степень захвата аминокислот выражали отношением числа распадов осадка фракции (мин/мг) к числу распадов среды поглощения (мин/мкл).

Под влиянием НС наблюдается различная степень изменения захвата таурина семьявносящим протоком, тонкой кишкой, скелетной мускулатурой и надпочечниками. Захват таурина в СВП достигает 134%, однако в ТК, НА, СКМ заметного изменения захвата таурина не наблюдалось (таблица). В первой серии опытов исследовалось влияние адrenoблокатора пропранолола в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М на содержание таурина в различных органах животного. Из таблицы видно, что пропранолол вызывает снижение концентрации таурина в тонкой кишке на 37%, СКМ – на 27%, а в НА заметного изменения не происходит. Органы с преимущественной β -рецепцией (СКМ) и смешанной рецепцией (ТК) реагируют на введение пропранолола почти одинаковым снижением содержания таурина.

При блокаде рецепторов пропранололом в сочетании с НС наблюдается угнетение захвата в СВП и ТК, в то время как в СКМ, наоборот, его захват усиливается на 211%.

В надпочечниках, для гормонов которых эффекторные системы имеют различную рецепцию, получено значительное увеличение содержания таурина – на 82%.

Опыты были проведены также с ингибитором A -адrenoблокатора фентоламина в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М. Установлено, что ФА вызывает угнетение захвата таурина $[^{35}\text{S}]$ в СКМ на 18%, НА – на 41%, ТК – на 48%, а в СКП наблюдается положительный захват – 64%.

Из таблицы видно, что при совместной инкубации фентоламина в присутствии НС захват таурина активизируется только в надпочечниках – на 42%, тогда как в остальных изучаемых органах происходит его угнетение. Согласно результатам наших опытов, как при блокировании β -адренорецепторов пропранололом, так и A -рецепторов ФА НС стимулирует захват таурина в надпочечниках.

Особый интерес представляют данные о влиянии ингибитора нейронального захвата кокаина, который в концентрации $5 \cdot 10^{-7}$ М приводит к достоверному снижению захвата таурина $[^{35}\text{S}]$ всеми исследуемыми органами: в СКМ – на 34%, ТК – на 74%, НА – на 46%. Кокаин действует в испытуемых органах, по-видимому, как конкурентный ингибитор его захвата.

**Влияние НС на захват $[^{35}S]$ таурина в изолированных органах крыс при блокаде рецепторов,
счет мин/г**

Концентрация	$3 \cdot 10^{-9}$ и $3 \cdot 10^{-6}$ М	$5 \cdot 10^{-7}$ М		$5 \cdot 10^{-7}$ М		$5 \cdot 10^{-5}$ М		$0,3 \cdot 10^{-8}$ М		$0,3 \cdot 10^{-8}$ М		$0,15 \cdot 10^{-8}$ М		$0,29 \cdot 10^{-8}$ М	
	НС-0,28 ФДЭ	ПП	ПП+ НС	ФА	ФА+ НС	КОК	КОК+ НС	НТ	НТ+ НС	НА	НА+ НС	АТР	АТР+Н С	АМ	АМ+Н С
Скелетная мускулатура	-4	-27 ⁺⁺	+211 ⁺⁺⁺⁺	+18 ⁺⁺	-10 ⁺	-34 ⁺⁺	+117 ⁺⁺⁺	-7	-87 ⁺⁺⁺⁺	-75 ⁺⁺⁺	+83 ⁺	+12	-52 ⁺⁺⁺⁺	-22	-38 ⁺⁺⁺
Семявыносящий проток	+134 ⁺⁺⁺	97 ⁺⁺⁺	-6	+64 ⁺	-20 ⁺	+34 ⁺	+23	+6 ⁺	-72 ⁺⁺⁺	-26	+142 ⁺⁺⁺	+55 ⁺⁺	+62 ⁺	+114 ⁺⁺⁺	+36 ⁺
Надпочечники	-4	+28	+82 ⁺⁺⁺⁺	-41 ⁺⁺	+42 ⁺	-46 ⁺⁺⁺⁺	+6	-37 ⁺	-41 ⁺⁺⁺	-55 ⁺⁺⁺⁺	+148 ⁺⁺⁺⁺	-25 ⁺⁺	-31 ⁺	-7	-16 ⁺
Тонкая кишка	-1	-37	-3	-48 ⁺⁺⁺	-39 ⁺⁺⁺	-74 ⁺⁺⁺⁺	87 ⁺⁺⁺	-44 ⁺	-71 ⁺⁺⁺⁺	-81 ⁺⁺⁺⁺	+3	-15	-15	-24	+12

Примечания. Вероятность ингибиторов и НС приведена в сравнении с контролем, а сочетание ингибиторов +НС – с результатами соответствующих ингибиторов. Разница с контролем статистически достоверна: *P<0,05; **P<0,02; ***P<0,01; ****P<0,001. Средние данные по 6-12 опытам.

Как видно из таблицы, НС не только снимает угнетающий эффект кокаина, но и приводит к заметному усилению захвата: в СКМ – на 117%, в ТК – на 87%, в СВП – на 23%. Вместе с тем в НА увеличения захвата не наблюдается.

В следующей серии опытов исследовалось влияние блокатора опиоидных рецепторов налтрексона в дозе $0,3 \cdot 10^{-8}$ М. Последний в СКМ и СВП на захват таурина заметно не воздействует, а в НА и ТК снижает его на 37% и 44% соответственно. Сочетание НТ и НС приводит к глубокому снижению захвата во всех исследуемых органах: в СКМ – на 87%, СВП – на 72%, НА – на 41% и ТК – на 71%. НС действует в органах как конкурентный ингибитор захвата нейромедиаторов, конкурируя с ним за точку приложения на пресинаптической мембране.

Другой ингибитор опиоидных рецепторов налоксан – аналог налтрексона в той же дозе вызывает гораздо более глубокое угнетение захвата: в СКМ – на 75%, СВП – на 26%, НА – на 55% и ТК – на 81%. Интересно отметить, что при отдельной инкубации в присутствии НС и НТ захват таурина резко снижается, в то время как при совместной инкубации НС и НА происходит достоверная активация интенсивности процессов захвата таурина: в СКМ – на 83%, СВП – на 142%, НА – на 148%. Эти данные свидетельствуют о влиянии НА и НТ на различные изорецепторы морфина и действия НС на эти процессы, возможно, благодаря наличию разных опиум рецепторов, которые чувствительны к различным веществам.

Холинолитики амизил и атропин не действуют на процесс захвата таурина в указанных органах и только лишь в СВП усиливают захват на 114 и 55% соответственно.

Из таблицы видно, что разные органы по-разному реагируют на захват при блокаде рецепторов в сочетании с НС. В случае ТК НС не играет существенной роли в накоплении таурина, тогда как в других исследуемых органах наблюдается положительный захват.

Сравнивая данные по захвату таурина при блокаде разных рецепторов в другой гладкой мышце – тонкой кишке, можно отметить диаметрально противоположную картину. Если в СВП НС резко увеличивал захват таурина – на 134%, то в тонкой кишке он абсолютно инертен.

Если все блокаторы α , β -рецепторов, рецепторов морфина и холинорецепторов заметно повышают захват таурина, а НС (при сочетании) – понижает, то в тонкой кишке все блокаторы резко уменьшают захват таурина, а НС во всех случаях имеет тенденцию увеличивать захват, приближая его к нормальному состоянию. Особенно это видно при использовании кокаина, ингибитора нейронального захвата, при сочетании с НС как в тонкой кишке, так и в скелетной мускулатуре. НС снимает ингибирующее влияние кокаина, резко увеличивая его захват от 34 до 117%.

а в ТК – от –84 до +87% (т.е. на 170%). Это вещество, вероятно, может служить хорошим средством в борьбе с кокаином или вообще с опиоидными веществами.

Большой экспериментальный материал, полученный в нашей лаборатории по изучению блокаторов различных рецепторов, дает основание А.А.Галояну выдвинуть гипотезу о том, что НС действует на определенный рецептор, по-видимому, на мембраны гладких мышц или других органов, как бы состоящие из большой молекулы, в которой имеются множественные участки, сходные по структуре с рядом рецепторов, и через этот рецептор регулируется чувствительность опиатных рецепторов, т.е. как бы существует связь рецептор-рецептор или общий рецептор для НС и подобных соединений, через который происходит регуляция функций других рецепторов, чувствительных к медиаторам.

Таким образом, имеющиеся в настоящее время экспериментальные данные позволяют считать, что НС играет существенную роль в регулировании выделения и синтеза нейромедиаторных аминокислот таурина в адренергическом и холинэргическом нейроне. Влияние НС на содержание таурина можно рассматривать и на уровне рецепторов таурина.

Институт биохимии им. Г.Х.Бунятыана НАН Армении

Մ. Շ. ՄՈՒՐԿԻՅԱՆ

Նեյրոհորմոն «С»-ի ազդեցությունը $[^{35}S]$ տաուրինի կլանման վրա առնետների տարբեր օրգանների կտրվածքներում ռեցեպտորների բլոկադայի դեպքում

Նեյրոհորմոն «С»-ն տաուրինի վրա տարբեր օրգաններում ազդում է ոչ միատեսակ: Այսպես, եթե սերմնածորանում նկատվում է 134% տաուրինի կլանման ինտենսիվացում, ապա մյուս օրգաններում կլանման էական տեղաշարժ չի նկատվում: Մորֆինո-խոլինո-ադրենալ ռեցեպտորների բլոկադայի ժամանակ համարյա բոլոր ուսումնասիրված օրգաններում նկատվում է տաուրինի կլանման ճնշում, մինչդեռ նեյրոհորմոն «С»-ի համակցության պայմաններում նկատվում է կլանման ինտենսիվացում, որոշ դեպքերում ընդհուպ մինչև 1,5-2 անգամ:

Ըստ երևույթին ամինաթթվի կլանման ուժեղացումը նեյրոհորմոն «С»-ի ազդեցության ներքո կարելի է դիտել նեյրոնում տաուրինի ֆունկցիոնալ և մետաբոլիկ փոխանակության կարգավորումով:

ЛИТЕРАТУРА – ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ А.А.Галоян, ДАН АрмССР, т.34, №3, с.109-111 (1963). ² С.С.Абрамян, М.А.Ростомян, А.А.Галоян, Кровообращение, т.8, с.12 (1975). ³ А.А.Галоян, Б.Я.Гурвиц, Р.Т.Галстян, Вопр. биохимии мозга, Ереван, Изд.АН АрмССР, вып.11, с.197 (1977). ⁴ А.А.Галоян, Б.Я.Гурвиц, М.А.Погосян, Вопр. биохимии мозга, Ереван, Изд.АН АрмССР, вып.10, с.197 (1976). ⁵ А.А.Галоян, М.Д.Чифликян, М.Ш.Мурадян и др., Нейрохимия, т.5, №1, с.45-48 (1986). ⁶ А.А. Galoyan, G. A. Kevorkian, L. H. Voskanian et al.,

J. Neurochem. Res., v.13, №5, p.493-497 (1988). ⁷ Р.О.Карапетян, М.Ш.Мурадян, Т.В.Попова и др., Биол. ж. Армении, т.6, №43, с.483-488 (1990). ⁸ Т.Н.Путинцева, Р.О.Карапетян, ДАН АрмССР, т.69, №2, с.119-124 (1979). ⁹ А.А.Галоян, М.Ш.Мурадян, Биол. ж. Армении, т.32, №2, с.104-110 (1979). ¹⁰ J.D.Welty, W.O.Read, J.Pharmacol. Exp.Theor., v.144, p.110 (1964). ¹¹ M.J.McBroom, J.D.Welty, J. Neurochem. Res., v.24, p.853-859 (1977). ¹² J.H.Knover, J.P.Chovan, S.W.Schaftan, Am. J.Physiology, 240, ph.238, h-246. ¹³ K.Kuriama, K.Nakagawa, In Taurine, ed. by R.Huxtable and A.Barbeau, Raven Press, N.Y., 1976. ¹⁴ N.Yasuo, Y.Yokio, L.Walter, Biochem. Pharmacol., v.27, №23, p.2689 (1978). ¹⁵ Л.Мальчикова, Н.В.Сперанская, Е.Р.Елизарова, Бюлл. эксп. биологии, №12, с.135-138 (1979). ¹⁶ М.Ш.Мурадян, А.Н.Едигарян, Р.О.Карапетян, ДАН АрмССР, т.76, №5, с.225-230 (1983). ¹⁷ J.A.Awarara, B.Michael, In Taurine ed. by R.Huxtable and A.Barbeau, Raven Press, 1976. ¹⁸ C.L.Skelton, G.S.Levy, S.F.Epstein, Circul.Res., v.26, p.35-44 (1970). ¹⁹ Z.K.Kaczmarek, A.N.Davissau, J. Neurochem., v.19, p.2355-2362 (1972). ²⁰ S.Fujimoto, H.Iwata, Y.Yonada, Jap. J Pharm., v.26, p.105 (1976). ²¹ J.J.Coule, J.Axelrod, J. Neurochem., v.18, p.2061 (1971).