

УДК 591.046+392

АДРЕНОРЕЦЕПТИВНЫЕ СТРУКТУРЫ В РАННИХ ЗАРОДЫШАХ ШПОРЦЕВОЙ ЛЯГУШКИ (*XENOPUS LAEVIS*)

Ю. Б. Шмуклер, Н. Г. Григорьев, Г. Н. Московкин

Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова АН СССР, Москва

Резюме

Изучали связывание меченых лигандов к β -адренорецептору ^3H -дигидроальпренолола (ДГА) и ^{125}I -иодоцианоинодолола (ЦП) в тотальном гомогенате и субклеточных фракциях зародышей шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* в период делений дробления. Обнаружено специфическое связывание этих лигандов, что подтверждается снижением активности при добавлении «холодного» пропранолола и адреналина. Константа диссоциации для ^3H -ДГА равна $3 \cdot 10^{-9}$ М, а для ^{125}I -ЦП — $1.5 \cdot 10^{-9}$ М. Помимо высокоаффинного малоемкого пула в зародышах присутствует и низкоаффинный пул большой емкости. Охлаждение исследуемого материала до 4°C в течение 2 ч увеличивает специфическое связывание при снижении аффинности адренорецептивных структур зародыша. Обсуждается соответствие результатов, полученных в данной работе, а также ранее полученных данных критериям внутриклеточного трансмиссивного процесса.

Введение

Изучение роли низкомолекулярных регуляторов раннего эмбриогенеза, химически идентичных нейромедиаторам, привело за последнюю четверть века к накоплению значительного объема данных [1—3]. Наиболее изучено и может считаться доказанным участие этих веществ (здесь и далее в отличие от термина «нейромедиаторы» — трансмиссивы) в таких ключевых процессах зародышевого развития, как цитокинез, ранние межклеточные взаимодействия, эмбриональная моторика и т. д. [3, 4]. Среди существенных черт «донервного» трансмиссивного процесса, отличающего его от нейромедиаторного, является внутриклеточная локализация соответствующих гипотетических рецептивных структур. Первоначальные данные, указывающие на это, были получены в опытах на зародышах морских беспозвоночных с помощью препаратов антитрансмиссивного действия, различающихся по способности проникать через плазматическую мембрану [3, 5]. Позднее проведено и прямое введение трансмиссивов и их антагонистов в клетки зародышей с помощью микроинъекции и электрического пробоя мембраны, подтверждающее внутриклеточную локализацию соответствующих рецептивных структур [6—8]. В настоящее время имеющиеся данные удовлетворяют большинству критериев как нейромедиаторного, так и трансмиссивного эмбрионального процессов [4]: 1) в клетках ранних зародышей обнаружены эндогенные трансмиссивные вещества и прослежена динамика их содержания в клеточном цикле; 2) введение антитрансмиссивных веществ в клетки зародышей вызывает физиологический ответ в виде блокады клеточ-

ного деления; 3) последний эффект устраняется при добавлении соответствующего трансмиттера; 4) введение трансмиттера в некоторых случаях имеет собственный эффект, противоположный по направленности действию антитрансмиттерных препаратов [3, 6, 8]. Существенным пробелом, однако, является отсутствие данных о собственно рецептивных структурах к трансмиттерам. Предлагаемая работа является первой попыткой обнаружить и охарактеризовать эти структуры в ранних зародышах шпорцевой лягушки *Xenopus laevis*, объекта наших предыдущих исследований [6, 7].

Материал и методы

Опыты проводили на зародышах *Xenopus laevis* на стадиях делений дробления. Зародышей получали стандартным способом [9] и освобождали от студенистой оболочки 2 %-ным цистеином при pH 8,0, после чего отмывали отстойной водой и буфером: 60 мМ KCl, 25 мМ NaCl и 35 мМ Трис-HCl. Зародышей гомогенизировали в том же буфере в стеклянном гомогенизаторе Поттера на холоду. В экспериментах использовали полученный таким образом гомогенат либо его фракции. Митохондриальную фракцию получали центрифугированием гомогената при 2000 g в течение 15 мин, а образующегося супернатанта — при 10 000g в течение 20 мин. Осадок после второго центрифугирования содержал митохондриальную фракцию. Супернатант второго центрифугирования подвергали центрифугированию при 175 000 g в течение 45 мин для получения осадка микросомальной фракции [10]. Для изучения рецептивных структур применяли меченые лиганды к β -адренорецепторам ^{125}I -иодоцианопиндолол (ЦП, 2000 Ки/ммоль) и ^3H -дигидроальprenолол (ДГА, 30—60 Ки/ммоль; «Амершэм», Великобритания). В качестве конкурентных лигандов использовали пропранолол («Сигма», США) и адреналин («Кальбиокем», Швейцария). Инкубацию проводили при 25 °C в течение 1 ч в объеме 0,5 мл, после чего материал наносили на фильтры GF/B (Whatman, USA) на холоду. Фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы с сцинтиллятором ЖС-8 и регистрировали активность проб в радиоизотопном счетчике фирмы «Contron» (Франция).

Результаты

В опытах на тотальном гомогенате из ранних зародышей шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* обнаружено специфическое связывание ^3H -ДГА в концентрации 6 нМ при использовании в качестве «холодного» лиганда пропранолола

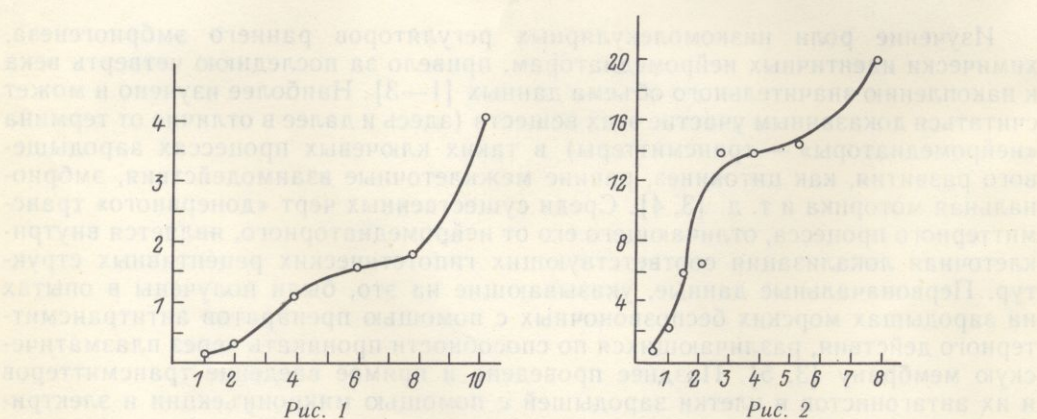


Рис. 1. Связывание ^3H -дигидроальprenолола микросомальной фракцией зародышей (по результатам 11 экспериментов).

По оси абсцисс — концентрация лиганда ^3H -ДГА (нМ), по оси ординат — 10^3 расп/мин.

Рис. 2. Связывание ^{125}I -иодоцианопиндолола микросомальной фракцией зародышей (по результатам 5 экспериментов).

По оси абсцисс — концентрация лиганда ^{125}I -ЦП (нМ), по оси ординат — как на рис. 1.

(100 мкМ). Расчет показывает наличие приблизительно 10^{10} молекул на 1 зародыш, специфически связывающих лиганд к β -адренорецептору. В митохондриальной фракции также обнаружено специфическое связывание ^3H -ДГА в тех же условиях, что на тотальном гомогенате.

Наиболее подробно изучено связывание β -адренолигандов ^3H -ДГА и ^{125}I -ЦП на микросомальной фракции гомогената. Специфическое связывание этих веществ наблюдалось и здесь. Изучена зависимость специфического связывания от концентрации радиолигандов (рис. 1 и рис. 2). Результаты опытов указывают на существование в микросомальной фракции сравнительно высокоаффинного пула связывания (K_d для ^3H -ДГА равно $3 \cdot 10^{-9}$ М, а для ^{125}I -ЦП $1.5 \cdot 10^{-9}$ М), а также, возможно, низкоаффинного, но более емкого пула. Первые опыты с использованием адrenalина ($1 \cdot 10^{-3}$ — $1 \cdot 10^{-6}$ М) также показали его способность вытеснять ^3H -ДГА из мест связывания в микросомальной фракции.

Повышение температуры до 80°C в течение 10 мин приводит к полному устранению специфического связывания ^3H -ДГА при одновременном увеличении неспецифического. Охлаждение до 4°C в течение 2 ч и более, а также замораживание в жидком азоте приводит к увеличению специфического связывания, вероятно, сопровождающегося снижением аффинности рецептивных структур.

По предварительным данным, d-пропранолол, стереоизомер, являющийся неактивным на классических β -адренорецепторах [11], в данной системе оказывает действие на связывание ^3H -ДГА, сходное с действием рацемата.

Обсуждение

Таким образом, в ранних зародышах *X. laevis* присутствуют структуры, подобные β -адренорецепторам, что доказывается высокоаффинным специфическим связыванием меченых ДГА и ЦП. Вместе с ранее существовавшими данными о присутствии в клетках ранних зародышей биогенных моноаминов, в том числе адrenalина [3], и данными о физиологических эффектах фармакологических препаратов [6, 7] результаты, полученные в данной работе, позволяют констатировать наличие в клетках ранних зародышей *X. laevis* всех компонентов трансмиссивного процесса, отвечающих предложенным ранее критериям [4].

В предварительном порядке можно констатировать и некоторые особенности рассматриваемых адренорецептивных структур. Наряду с обычной утратой способности к специфическому связыванию лиганда при термическом шоке (80°C , 10 мин) адренорецептивные структуры ранних зародышей *X. laevis* обнаруживали термолабильность при холодовом воздействии, что выражалось в снижении аффинности и увеличении числа мест связывания. Отличием от классических β -адренорецепторов [11] является, по-видимому, и способность d-изомера к вытеснению меченого лиганда из мест связывания в ранних зародышах.

Методы, использованные в данной работе, не позволяют нам связать эмбриональные адренорецептивные структуры с какой-либо из выделенных фракций. Уточнение локализации адренорецептивных структур и их подробная характеристика явится важным направлением нашей дальнейшей работы.

Авторы выражают признательность заведующему аквариальной ИБР АН СССР Л. А. Гудкову за содействие в проведении данной работы, а также В. Ф. Манякову за ценные консультации.

Литература

- [1] Бузников Г. А. Низкомолекулярные регуляторы зародышевого развития. М.: Наука, 1967. 265 с. — [2] *Buznikov G. A.* The action of neurotransmitters and related substances on early embryogenesis // *Pharmac. Ther.* 1984. Vol. 25. P. 23—59. — [3] Бузников Г. А. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. М.: Наука, 1987. 232 с. — [4] *Buznikov G. A., Shmukler Yu. B.* The possible role of «pre-nervous» neurotransmitters in cellular interactions of early embryogenesis: a hypothesis // *Neurochem. Res.* 1981. Vol. 6, N 1. P. 55—69. — [5] Бузников Г. А., Шмуклер Ю. Б. Влияние препаратов-антимедиаторов на межклеточные связи у ранних зародышей морских ежей // *Онтогенез.* 1978. Т. 9, № 2. С. 173—178. — [6] *Shmukler Yu. B., Grigoriev N. G., Buznikov G. A., Turpaev T. M.* Regulation of cleavage divisions: participation of «pre-nervous» neurotransmitters coupled with second messengers // *Comp. Biochem. Physiol. Pt C.* 1986. Vol. 83, N 2. P. 423—427. — [7] Шмуклер Ю. Б., Григорьев Н. Г., Бузников Г. А., Турпаев Т. М. Специфическое торможение делений дробления у *Xenopus laevis* при микроинъекции пропранолола // *Докл. АН СССР.* 1984. Т. 274, № 4. С. 994—997. — [8] Григорьев Н. Г., Шмуклер Ю. Б. Изучение регуляции цитокинеза ранних зародышей морского ежа с помощью электрического пробоя мембраны // *Докл. АН СССР.* 1986. Т. 287, № 2. С. 463—466. — [9] *Детлаф Т. А., Руднева Т. Б.* Шпорцевая лягушка *Xenopus laevis* Daudin // *Объекты биологии развития.* М.: Наука, 1975. С. 392—441. — [10] *Гаузе Г. Г.* Методы выделения субклеточных структур // *Методы биологии развития.* М.: Наука, 1974. С. 333—340. — [11] *Atlas D., Steer M. L., Levitzki A.* Stereospecific binding of propranolol and catecholamines to the β -adrenoreceptor // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1974. Vol. 71, N 10. P. 4246—4248.

Поступила 29 IV 1988

ADRENERGIC STRUCTURES IN EARLY EMBRYOS OF THE CLAWED TOAD *XENOPUS LAEVIS*

Yu. B. Shmukler, N. G. Grigor'ev, G. N. Moskovkin

Institute of Developmental Biology, USSR Academy of Sciences, Moscow

SUMMARY

Studies have been made on the binding of labeled ligands to β -adrenoreceptor — ^3H -dihydroalprenolol (DHA) and ^{125}I -iodocyanopindolol (ICP) — in crude homogenate and subcellular fractions of toad embryos during cleavage divisions. Specific binding of these ligands was observed which is confirmed by a decrease of the activity after addition of cold propranolol or adrenalin. The value of K_d for DHA is equal to $3 \cdot 10^{-9}$ M for ICP — to $1.5 \cdot 10^{-9}$ M. In addition to this high-affinity pool of binding with a low capacity, a low-affinity and high-capacity pool was also found. Cooling of the preparation up to 4 °C for 2 h increases the specific binding simultaneously with a decrease of the affinity of adrenoreceptive structures of the embryo. The data obtained are discussed in relation to the criteria of intracellular transmitter process.