

УДК 577.17

БИОХИМИЯ

А. С. Киракосова, С. П. Манджиян, А. А. Галоян

Действие нейрогормонов «С» и «К» на калликреин-кининовую систему плазмы крови крыс

(Представлено 17/VI 1974)

Несмотря на достижения в изучении калликреин-кининовой системы (¹⁻³), связь ее с другими биологически активными соединениями и гормонами остается не достаточно выясненной.

С этой целью мы решили изучить влияние двух не известных ранее коронарорасширяющих нейрогормонов низкомолекулярной природы, выделенных А. А. Галояном (⁴) из гипоталамо-нейрогипофизарной системы крупного рогатого скота и условно названных «С» и «К», на некоторые компоненты калликреин-кининовой системы.

Непосредственное определение в крови свободных кининов затрудняется тем, что время их жизни в организме составляет весьма короткий срок (⁵). Тем самым, важную роль приобретает определение некоторых других показателей этой многокомпонентной системы, таких как спонтанная эстеразная активность, протеолитический фермент—калликреин, освобождающий кинины из кининогена плазмы, ингибитор калликреина, который, соединяясь с ферментом, образует лабильный комплекс—калликреин+ингибитор и тем самым участвует в регуляции уровня плазмакининов.

Определяли три компонента калликреин-кининовой системы: 1) спонтанную эстеразную активность; 2) прекалликреин и 3) ингибитор калликреина по методу Колмана и соавт. (⁶) в некоторой модификации Гомазкова и соавт. (⁷), которая заключалась в применении другого синтетического субстрата—N-бензоил-L-аргинин-этилового эфира (БАЭЭ) с фотометрическим измерением продуктов реакции гидроксаматным методом Брауна (⁸).

В основе метода Колмана и соавт. (⁶) лежит специфическая активация плазмы крови каолином, при которой из прекалликреина образуется калликреин, благодаря быстрой активации фактора Хагемана и его фрагмента XII f (⁹). Максимум активности калликреина определяется на 1-й минуте активации плазмы каолином. Аргинин-эстеразную активность образовавшегося калликреина определяли по расщеп-

лению синтетического субстрата БАЭЭ. Эстераза, активируемая каолином, в отличие от других эстераз крови является истинно калликренном (¹⁰), т. е. реакция эта строго специфическая. Быстрое падение эстеразной активности после максимального активирования ее обусловлено ингибированием плазменного калликрена. По величине этой заторможенной активности, измеренной через 10 минут после воздействия каолина и судят об активности его ингибитора.

Кроме этих двух показателей измеряется также исходная спонтанная аргинин-эстеразная активность, куда помимо калликрена входит свободная активность плазмينا, тромбина и других эстераз.

Спонтанная эстеразная активность определяется без экспозиции плазмы каолином.

Для измерения калликриногена и ингибитора калликрена плазму крови активировали равным объемом суспензии каолина (10 мг каолина на 1 мл 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,6) на водяной бане при 25°C. По прошествии 1 и 10 минут брали по 0,2 мл каолин-плазменной суспензии и инкубировали с 0,7 мл 0,02 М раствора БАЭЭ и 0,8 мл 0,1 М трис-НСI буфера, рН 8,0 на водяной бане при 37°C в течение 20 минут. Ферментативная реакция прекращалась добавлением по 0,8 мл 10% ТХУ.

После центрифугирования в полученном супернатанте определяли количество БАЭЭ, оставшееся после гидролиза ферментом. Для развития цветной реакции, 1 мл супернатанта добавляли к 1 мл щелочного раствора гидроксиламина. После минутного встряхивания приливают последовательно по 0,5 мл 3N HCl и по 1 мл 10% ТХУ. Получают окрашенный комплекс, количество которого определяется на СФ при 540 мк.

Калибровочный график строили, используя 0—10 мкмоль забуференного БАЭЭ.

Опыты проводили на беспородных крысах весом 150—200 г. Нейрогормоны «С» и «К» вводили крысам внутривенно в дозе 0,2—0,4 мкг под легким эфирным наркозом. Крыс забивали декапитацией спустя 30 минут после введения нейрогормонов.

В качестве антикоагулянта использовали 3,8%-ный лимоннокислый натрий. Кровь брали в полиэтиленовые пробирки для предотвращения активации калликрена. Дальнейшую обработку проб проводили в силиконированной посуде.

Результаты определения основных компонентов калликреин-кининовой системы под действием нейрогормона «С» приведены в табл. 1.

В норме в плазме крови крыс определяются следующие показатели калликреин-кининовой системы: исходная (спонтанная) аргинин-эстеразная активность— $21,21 \pm 3,32$ мкмоль гидролизованного субстрата (БАЭЭ) на 1 мл плазмы в 1 час; калликриноген— $134,16 \pm 8,57$ мкмоль БАЭЭ; ингибитор калликрена— $1,22 \pm 0,077$ единиц ингибитора. Данные хорошо согласуются с результатами работы О. А. Гомазкова и соавт. (¹¹ ¹²). В крови человека получены более низкие величины этих

показателей (13, 14), что объясняется, по-видимому, несколько отличающейся друг от друга кининовой системой крови крыс и человека.

При введении крысам нейрогормона «С» наблюдается понижение спонтанной эстеразной активности с $21,21 \pm 3,32$ мкмоля в контрольных опытах до $12,92 \pm 2,51$ под воздействием нейрогормона «С». Однако уровень калликреиногена, а также ингибитора калликреина почти не подвергается изменениям.

Таблица 1

Активность компонентов калликреин-кининовой системы плазмы крови крыс в норме и при введении нейрогормона «С»

Определяемый компонент	Контроль	Через 30 мин после введения нейрогормона «С»	Достоверность
СА	$21,21 \pm 3,32$	$12,92 \pm 2,51$	$P < 0,05$
ПКК	$134,16 \pm 8,57$	$139,77 \pm 12,90$	$P > 0,5$
ИК	$1,22 \pm 0,077$	$1,12 \pm 0,08$	$P > 0,5$

Обозначения: СА—спонтанная эстеразная активность (в мкмолях БАЭЭ в 1 мл плазмы за 1 час); ПКК—прекалликреин (в мкмолях БАЭЭ в 1 мл плазмы за 1 час); ИК—ингибитор калликреина (в условных единицах).

Таблица 2

Активность компонентов калликреин-кининовой системы плазмы крови крыс в норме и при введении нейрогормона «К»

Определяемый компонент	Контроль	Через 30 мин после введения нейрогормона «К»	Достоверность
СА	$21,21 \pm 3,32$	$13,71 \pm 4,99$	$P < 0,25$
ПКК	$134,16 \pm 8,57$	$216,40 \pm 13,01$	$P > 0,02$
ИК	$1,22 \pm 0,077$	$1,24 \pm 0,13$	$P < 0,5$

Обозначения те же, что и на табл. 1.

Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что нейрогормон «С» почти не действует на уровень калликреиногена, понижение же спонтанной эстеразной активности, по-видимому, объясняется действием нейрогормона «С» на другие эстеразы некалликреинового происхождения, вызывая их уменьшение.

Нейрогормон «К», наоборот, почти удваивает количество калликреиногена, при этом заметна тенденция к понижению и спонтанной эстеразной активности (табл. 2). Эти данные показывают, что, по-видимому, нейрогормон «К» может действовать на эстеразную активность ингибированием превращения калликреиногена в калликреин.

Таким образом, нейрогормоны «С» и «К» действуют на кининовую систему плазмы крови крыс разными механизмами.

Նեյրոհորմոն «С» և «К» ազդեցությունն առնետների արյան պլազմայի կալիկրեին-կինինային սիստեմի վրա

Առնետների վրա կատարված փորձերը ցույց են տվել, որ նեյրոհորմոն «С» ներերակային ներարկման ժամանակ նկատվում է էստերազային սպոնտան ակտիվության որոշակի իջեցում: Միաժամանակ չի նկատվում կալիկրեինոզենի և կալիկրեինի ինհիբիտորի քանակության փոփոխություն, իսկ քաջատրվում է ըստ երևույթին, ոչ կալիկրեինային բնույթի էստերազների քանակության փոփոխում:

Նեյրոհորմոն «К»-ն ավելացնում է կալիկրեինոզենի քանակությունը, որը ցույց է տալիս կալիկրեինոզենից կալիկրեինի փոխարկման արգելակում:

Ըստ երևույթին նեյրոհորմոն «С» և «К» ազդում են առնետների արյան պլազմայի կինինային սիստեմի վրա տարբեր մեխանիզմներով:

ЛИТЕРАТУРА — ԿՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

- ¹ Т. С. Пасхина, В кн. Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов, М., стр. 317 (1969). ² М. С. Суровикина, Успехи совр. биол., 68, 35 (1969). ³ М. Schachter, Physiological Reviews, 49, 509, (1969). ⁴ А. А. Галоян, Вопр. биохимии мозга. Изд. АН Арм. ССР, VIII, 107 (1973). ⁵ К. Saameli, T. K. Eskes, Am. J. Physiol., 203, 216; (1961) ⁶ R. W. Colman, J. W. Mason, S. Sherry, Ann. Intern. Med., 71, 763, (1969). ⁷ О. А. Гомазков, И. В. Комиссарова, Л. В. Большакова, Н. Н. Теплова, Кардиология, 6, 25 (1972). ⁸ M. E. Brown, J. Lab. Clin. Med. 55, 616, (1960). ⁹ M. I. Soltay, H. Z. Mouat, A. H. Ozge Anwar, Proc. Soc. Exp. Biol., 138, 952 (1969). ¹⁰ R. W. Colman, L. Mautler, S. Sherry, J. Clin. Invest., 48, 11, 23 (1969). ¹¹ О. А. Гомазков, Л. В. Большакова, М. В. Шумкович, И. В. Комиссарова, Кардиология, 4, 22 (1972). ¹² О. А. Гомазков и др., Бюлл. эксп. биол. и мед., 8, 25 (1973). ¹³ P. Wong, R. W. Colman et al., Annals Intern. Med., 77, 205 (1972). ¹⁴ Т. С. Пасхина и др. Вопросы мед. химии, 16, 152 (1970).