ՀԱՅԿԱԿԱՆ ՍՍՀ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԿԱԴԵՄԻԱՅԻ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ
ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК АРМЯНСКОЙ ССР

LXVI 1978 5

УДК 577.17

БИОХИМИЯ

Б. Я. Гурвич, Г. А. Сарибекян, Е. С. Сомова,
член-корреспондент АН Армянской ССР А. А. Галоян

Коррелятивная зависимость между ингибированием активности фосфодиэстеразы циклического 3′,5′-аденозинмонофосфата мозга и сердца крыс in vitro и коронарорасширяющим эффектом нейрогормона «С» in vivo

(Представлено 3/II 1978)

В 60-х годах одним из нас была выделена (1) из гипоталамуса млекопитающих новая группа нейрогормонов с сильно выраженным коронарорасширяющим свойством. В последующем эти вещества условно были названы нами «К», «С», «Г».

Было показано, что нейрогормон «С» заметно стимулирует гликогенолитический процесс, особенно в сердечной мышце, повышая фосфорилазную активность, скорость распада гликогена, накопление лактата и т. д. (2,3). Нейрогормон «С» реализует свой эффект через циклические нуклеотиды путем ингибирования фосфодиэстеразы 3′,5′-цАМФ сердца и мозга крыс in vitro (4). Известно, что большинство гормонов реализует свои эффекты через систему образования и распада 3′,5′-циклического аденозинмонофосфата (5).

В настоящей работе была сделана попытка найти корреляционную зависимость между ингибирующим эффектом 3′,5′-цикло АМФ фосфодиэстеразы (ФДЭ) и коронарорасширяющим действием нейрогормона «С», а также дать количественную характеристику оптимально действующих доз нейрогормона «С» in vivo и in vitro.

Это позволит произвести стандартизацию нейрогормона «С» по новому биохимическому тесту, что весьма важно в теоретическом и практическом плане.

Количественная стандартизация нейрогормона позволит установить пороги физиологической активности нейрогормона «С» в метаболизме и сердечной деятельности животных in situ.

Активность 3′,5′-цикло-АМФ фосфодиэстеразы определяли по количеству гидролизованного субстрата (цАМФ) в процессе его инкубации с ферментом.

О характере гидролиза свидетельствовало падение радиоактивности

(^{3}H)3′,5′-ц АМФ, использованного в качестве маркера. Нами был применен микрометод, предусматривающий разделение продуктов гидролиза с помощью восходящей тонкослойной хроматографии на силикагеле ([6]).

Опыты проводили на белых крысах весом 200—300 *г*. Исследуемые органы (мозг, сердце) извлекали, промывали, взвешивали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в 10 объемах 160 мМ трис-HCl буфера (pH 7,5), содержащего 5 мМ $MgCl_2$. Гомогенат центрифугировали (2000g, 10 *мин*) и супернатант использовали в качестве источника ФДЭ. В связи с высоким уровнем активности ФДЭ мозга супернатант этой ткани разводили тем же буфером в соотношении 1 : 10 в то время как супернатант гомогената сердца разводили в соотношении 1 : 2. Все указанные операции проводили при 0°С. Фермент с субстратом инкубировали в термостате при 37°С в течение 20 минут. Так как радиоактивность продукта гидролиза ^{3}H-5′АМФ также отражает активность ФДЭ, для предотвращения дальнейшего разложения ^{3}H-5′АМФ под действием 5′-нуклеотидазы инкубацию проводили в присутствии 2 мМ 5′АМФ (немеченого). Нейрогормон «С» (или бидистиллат в контрольных пробах) предварительно смешивали с супернатантом гомогенатов мозга и сердца перед внесением в инкубационные пробирки. Конечный объем реакционной смеси составлял 10 *мкл*. Состав инкубационной смеси в молях (конечная концентрация): трис—HCl буфер, pH 7,5—0,1; $MgCl_2$—$3 \cdot 10^{-3}$; цАМФ—$0{,}25 \cdot 10^{-4}$; ^{3}H—цАМФ—10^{-6} (0,2 мккюри); 5′АМФ—$2 \cdot 10^{-3}$; гомогенат сердца, соответствующий 110 *мкг* ткани, или 30 *мкг* мозга. Нейрогормон „С" (2 *мкл*) вводили в различных концентрациях: от $2 \cdot 10^{-3}$ доз до $2 \cdot 10^{-5}$ доз (за одну дозу принято количество нейрогормона „С", вызывающее увеличение объемной емкости крови, оттекающей из коронарных синусов сердца кошки, за единицу времени на 100%).

Реакцию начинали добавлением 5*мкл* ферментного препарата (гомогената) к реакционной смеси. Реакцию приостанавливали в кипящей водяной бане в течение 3 минут. После охлаждения до комнатной температуры пробы центрифугировали (3000 g, 15 *мин.*) и 3 *мкл* супернатанта хроматографировали в системе: н-бутанол-ацетон-NH_4OH (8 : 2 : 1). Пятна на хроматограмме идентифицировали с помощью свидетелей в ультрафиолете, фиксировали специальным клеем, приготовленным на основе ацетата целлюлозы ([7]), соответствующие участки вырезали и помещали в сцинтилляционные кюветы с толуольным сцинтиллятором. Счет радиоактивности производили на жидкостных сцинтилляционных спектрометрах SL-40 (Франция). Суммарный счет хроматограмм обычно составлял $2{,}5—3 \cdot 10^4$ имп./*мин*.

При расчете ферментативной активности учитывали результаты хроматографирования меченого препарата ^{3}H-цАМФ, а также проб, взятых без инкубации. Содержание белка определяли в супернатанте гомогенатов по методу Лоури ([8]).

В качестве основных материалов использовали: цАМФ фирмы

Buchs SG (Швейцария), ^{3}H—цАМФ с удельной активностью 22,1 кюри (*ммоль*), New England Nuclear (США), 5' АМФ, Reanal (Венгрия), пластины „Силуфол UV—254", Kavalier (Чехословакия) и др.

Коронарорасширяющую активность нейрогормона «С» определяли путем измерения количества крови, оттекающей из коронарных синусов сердца кошки за единицу времени под уретановым наркозом (9). Нейрогормон «С» вводили внутривенно в различных концентрациях от 1 до $5 \cdot 10^{-2}$ доз; во избежание свертывания крови использовали гепарин (1000 ед./*кг*).

В табл. 1 сведены результаты ингибирования ФДЭ мозга крыс in vitro под действием различных концентраций нейрогормона «С» и соответствующее изменение объема венозной крови, оттекающей из коронарных синусов сердца кошки. Как видно из этой таблицы, между ингибирующим ФДЭ эффектом и степенью коронарорасширяющего влияния нейрогормона имеется количественная связь.

Таблица 1

Влияние различных концентраций нейрогормона «С» на ингибирование ФДЭ мозга крыс in vitro

Условия опыта	Единица измерения	Опыт							Контроль
Содержание нейрогормона „С" в 1 *мл* исходного препарата	дозы	10	1	$1 \cdot 10^{-1}$	$5 \cdot 10^{-2}$	$4{,}5 \cdot 10^{-2}$	$2 \cdot 10^{-2}$	$1 \cdot 10^{-2}$	0
Количество гидролизованного субстрата	% 1)	5±1,9	17±3,1	27±4,2	38±5,3	41±6,0	55±6,8	73±8,2	82±9,0
	2) нМ/*мг* ткани	0,43 ±0,17	1,47 ±0,27	2,34 ±0,36	3,29 ±0,46	3,55 ±0,52	4,77 ±0,6	6,32 ±0,71	7,1 ±0,78
	нМ/*мг* белка	7,65 ±2,93	26 ±4,8	41,4 ±6,4	58,1 ±8,2	62,7 ±9,2	84,2 ±10,5	111,8 ±12,4	128,5± ±13,7
Ингибирование ФДЭ	% ср.	94	79,3	67	54	50	33	11	0

1) За 100% принято количество негидролизованного субстрата.

2) Концентрация цАМФ в инкубационной смеси — $0{,}25 \times 10^{-6}$ М; ^{3}H-цАМФ — 10^{-6} М; содержание ткани мозга в пробе — 30 *мкг* сырой ткани (1,7 *мкг* белка) время инкубации 20 *мин*.

Полученные результаты показывают, что нейрогормон «С» в определенной концентрации, использованной в данном эксперименте, почти полностью ингибирует ФДЭ мозга (~ на 95%) (рис. 1).

Последовательное уменьшение концентраций нейрогормона «С», действующих на коронарное кровообращение, а также на ФДЭ в опытах in vitro приводит к соответствующему снижению как коронарорасширяющего эффекта, так и ингибирования ФДЭ. Подобная картина

характера и для других сосудорасширяющих и спазмолитических веществ, таких, например, как папаверин, этафенон, оксифедрин и др. При воздействии папаверина (100 *мкг/мл*) на интактные мышцы коронарных сосудов быка максимальная релаксация соответствовала полному ингибированию ФДЭ ([10]).

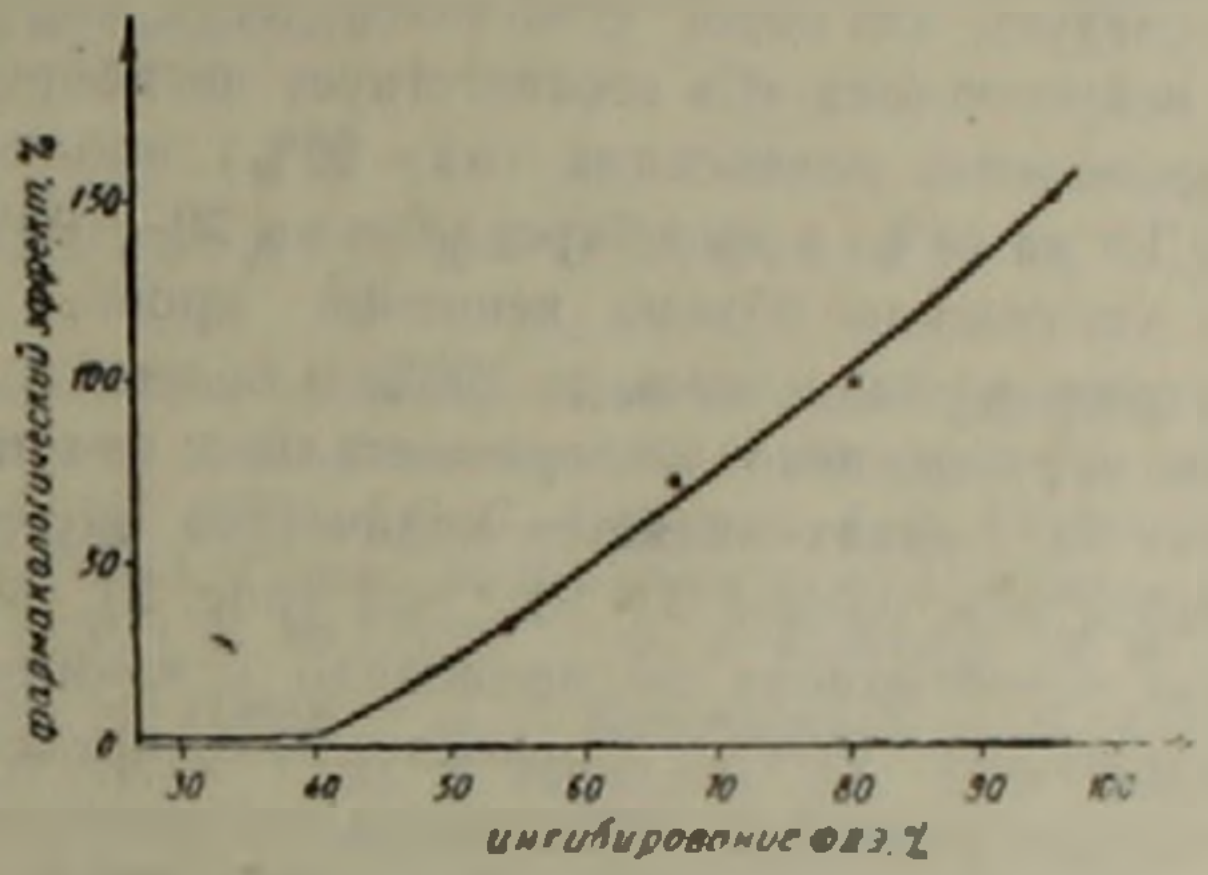

Рис. 1. Корреляция между коронарорасширяющим эффектом и ингибированием ФДЭ под действием нейрогормона «С»

Кроме того, при сравнении действия нейрогормона «С» с действием других релаксантов—ингибиторов ФДЭ проявляется еще одно сходство: едва заметное расширение сосудов наступает лишь после достижения уровня ингибирования ФДЭ не менее, чем на 50% по сравнению с контролем.

На рис. 2 показана корреляция концентрационных зависимостей ингибирования ФДЭ и фармакологического эффекта нейрогормона «С». Так как ингибирование ФДЭ мозга нейрогормоном «С» выражено значительно сильнее по сравнению с сердцем (рис. 1), то в опытах

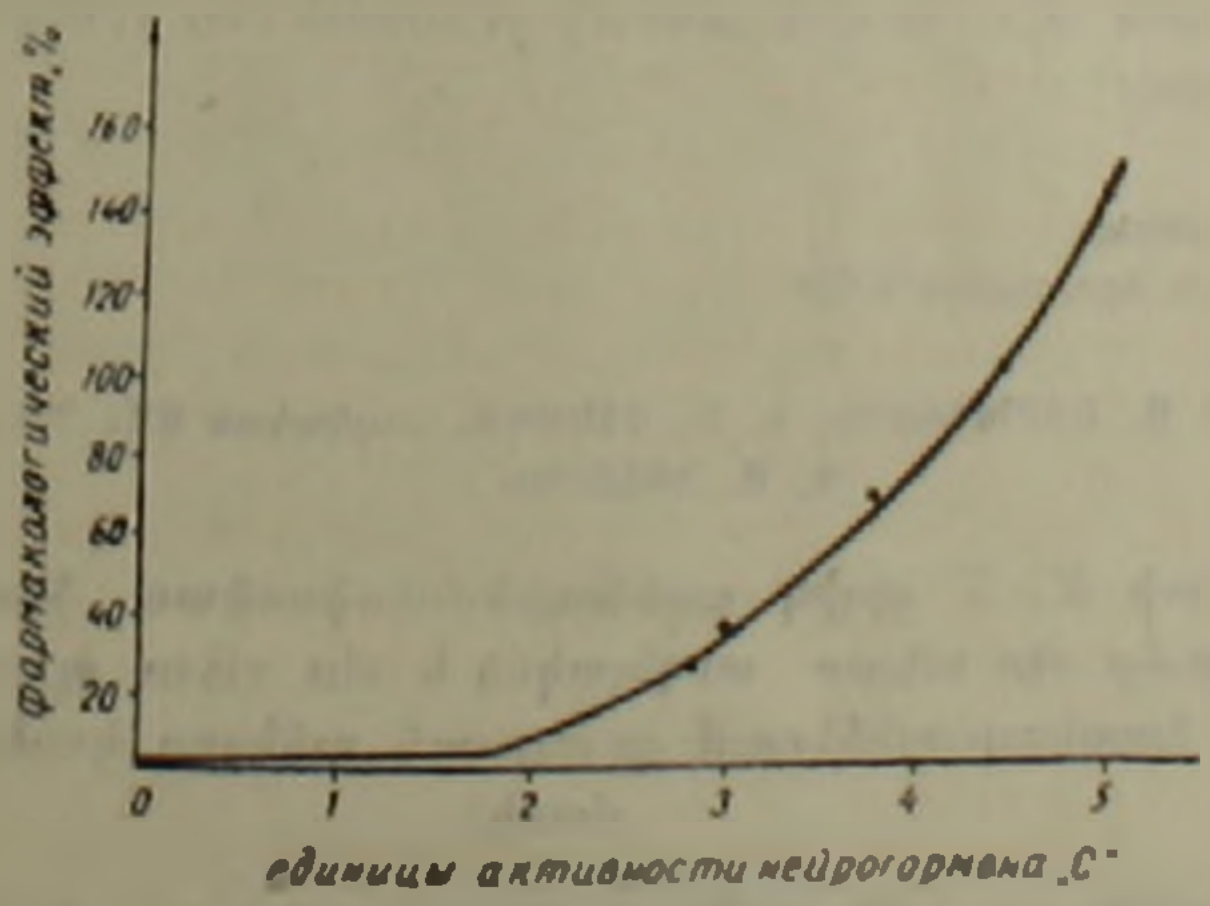

Рис. 2. Зависимость фармакологического эффекта от активности нейрогормона «С»

in vitro в качестве объекта для сравнительного анализа данных процессов целесообразно использовать ткань мозга. Однако, как показывают наши недавние эксперименты нейрогормон «С» весьма сильно ингибирует активность ФДЭ, изолированной из сердца быка. После соответствующих исследований можно включить в арсенал стандартизации нейрогормона «С» и этот тест.

Из рис. 1 следует, что порог чувствительности коронарорасширяющего эффекта нейрогормона «С» соответствует ингибированию ФДЭ на 40%, слабое проявление релаксации (на ~ 50%) наблюдается при ингибировании ФДЭ на 58%, а ингибирование на 70—100% эквивалентно значительному увеличению объема венозной крови, оттекающей из коронарных синусов сердца кошки, до 100% и более.

Нами было подтверждено экспериментально, что пределом разрешения в опытах на кошках является количество внутривенно введенного нейрогормона «С», равное $3 \cdot 10^{-2}$ доз (рис. 2). Введение указанного количества нейрогормона не приводило к каким-либо заметным изменениям коронарного оттока. Следовательно, представляется целесообразным определить единицу активности нейрогормона «С», как величину, соответствующую степени ингибирования ФДЭ.

За единицу активности нейрогормона «С» принимаем то количество препарата, которое ингибирует 1 миллиединицу ФДЭ гомогената (2000 *g*) мозга крыс в минуту при pH 7,5. То есть количество, увеличивающее содержание неактивированного цАМФ в среде на 1 *миллимоль* (или 1 наномоль) за минуту.

На основании рис. 2 можно сделать заключение, что эффективно действующими следует считать препараты нейрогормона «С», содержащие более 2,85 ед. активности.

Меньшие количества нейрогормона (2,7; 1,75; 0,6 ед.) не проявляют требуемого эффекта.

Для непосредственного фармакологического тестирования нейрогормона целесообразно пользоваться зависимостью, данной на рис. 2.

Данная работа может явиться важным шагом на пути к стандартизации нейрогормона «С», необходимому условию его успешного использования в медицине.

Институт биохимии
Академии наук Армянской ССР

Բ. Յա. ԳՈՒՐՎԻՑ, Դ. Ա. ՍԱՐԻԲԵԿՅԱՆ, Ն. Ս. ՍԻՄՈՎԱ, Հայկական ՍՍՀ ԳԱ թղթակից-անդամ
Ա. Ա. ԳԱԼՈՅԱՆ

Նեյրոհորմոն «C»-ի 3′, 5′ ցիկլիկ ադենոզինմոնոֆոսֆատ ֆոսֆոդիէսթերազայի ակտիվությունը «in vitro» արգելակող և «in vivo» պսակաձև անոթներն լայնացնող հատկություններում գոյություն ունեցող կոռելյատիվ կապի մասին

Նախկինում մենք ցույց ենք տվել, որ նեյրոհորմոն «C»-ն հանդիսանում է 3′, 5′-ցիկլո-ԱՄՖ ֆոսֆոդիէսթերազայի արգելակող. Սույն հետազոտությամբ

ցույց է տրված, որ նշված ֆերմենտի արգելակման աստիճանի և նեյրոհորմոն «C»-ի պսակաձև անոթները լայնացնող հատկության միջև կա բանական կապ։

Ստացված տվյալներից ելնելով նեյրոհորմոն «C»-ի ակտիվության միավոր է ընդունվում պրեպարատի այն քանակությունը, որը արգելակման է ենթարկում 3′, 5′-ցիկլո-ԱՄՓ ֆոսֆոդիէսթերազայի մեկ միլիմիավորը, որոշված ստանդարտ պայմաններում։

ЛИТЕРАТУРА — ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

[1] *А. А. Галоян*, Некоторые проблемы биохимии гипоталамической регуляции, Ереван, 1975. [2] *А. А. Галоян, С. С. Алексанян, Ж. Г. Абелян, Н. А. Бархударян*, ДАН Арм. ССР, т. 60, № 2, 117 (1975). [3] *С. С. Алексанян, А. А. Галоян*, ДАН Арм. ССР, т. 60, № 5, 293, 1975. [4] *А. А. Галоян, Б. Я. Гурвиц и М. А. Погосян* Вопр. биохимии мозга. Изд. АН Арм. ССР, т. II, 89 (1976). [5] *G. A. Robinson, R. W. Butcher et al* Ann. Rev. Biochem. 37, 149 (1968). [6] *Д. Р. Бериташвили и К. А. Кафиани*. Вопр. мед. химии, 322, т. 21 (1975). [7] *M. F. Turchinsky and L. P. Shershneva*, Anal Biochem. 54, 315 (1973). [8] *O. H. Lowry, N. J. Rosenbrough et al*, J. Biol. Chem. 193, 265 (1951). [9] *P. Z. Morawitz*, and *A Zahn* Dt Arch. Klin. med 116, 361 (1914) [10] *G. Pöch G.* and *W. R. Kukowetz*, Advances in Cyclic Nucleotide Res. N. Y. 1, 195 (1972).