

А. Г. Априкян, Н. В. Кочарян

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА *ВЬЮНИЯ АЛБА* НА УРОВЕНЬ ЦИКЛИЧЕСКОГО АМФ И АКТИВНОСТЬ АДЕНИЛАТЦИКЛАЗЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА

С глубокой древности в народной медицине с успехом использовались некоторые виды растений рода *Вьюния алба* в качестве средства с довольно широким диапазоном терапевтического действия [1, 2, 5]. Химический состав корней *Вьюния алба* представлен такими соединениями как: кукурбитацины и их гликозиды, имеющие структурное сходство с глюкокортикостероидами, ряд жирных кислот, пентациклические тритерпеновые кислоты, стерины, а также тригидроксиоктадекадиеновые кислоты, проявляющие простагландиноподобную активность [15].

Ранние исследования показали, что тригидроксиоктадекадиеновые кислоты, выделенные из этого источника, обладают гипогликемическим и тонизирующим действием [6]. Нами в экспериментах *in vivo* было показано, что экстракт *Вьюния алба* приводит к изменению спектра синтезированных *de novo* белков цитозольной и микросомальной фракций печени белых крыс [3]. Исследования нашей лаборатории по изучению регуляции синаптической активности головного мозга белых крыс [4] показали, что экстракт *Вьюния алба* резко ингибирует синапсосомальный захват нейромедиаторных аминокислот, стимулируя при этом их высвобождение из синапсом головного мозга.

Исходя из вышеприведенных данных, а также учитывая присутствие в экстракте *Вьюния алба* ряда физиологически активных соединений, представлялось весьма интересным исследование роли циклических нуклеотидов в механизме его действия. В настоящей работе нами представлены данные о влиянии экстракта *Вьюния алба* на уровень циклического АМФ и на активность аденилатциклазы мозговой ткани белых крыс в условиях *in vitro*.

Материал и методы

Исследования проводились на белых крысах-самцах популяции Вистар массой 150–200 г. Крыс декапитировали, головной мозг (без мозжечка) быстро отделяли, удаляли кровеносные сосуды и готовили 10% гомогенат на льду в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (8 строкров при 800 об/мин) в 10 мМ трис-буфере (рН 7,4), содержащем 0,32 М сахарозы. Полученный гомогенат разводили по белку до концентрации 1 мг/мл для определения содержания цАМФ или до 2 мг/мл для определения активности аденилатциклазы. Содержание белка определяли по методу Lowry и сопр. [12].

Влияние экстракта на уровень цАМФ определялось следующим образом: гомогенат (1 мл) инкубировали в водяной бане (37°C) при непрерывном перемешивании с возрастающими концентрациями экстракта в течение 30 мин или же в различные отрезки времени в случае изучения временной зависимости. К контрольным образцам вместо экстракта добавляли соответствующий объем дистиллированной воды. Для фиксации уровня цАМФ аденилатциклазную и фосфодиэстеразную ак-

тивности ингибировали кипячением реакционной смеси в течение 2 мин [11]. При определении эндогенного уровня цАМФ аналогичную обработку проводили перед инкубацией. Затем образцы гомогенизировали на льду в стеклянном гомогенизаторе со стеклянным пестиком (10 строкров при 800 об/мин) и центрифугировали в течение 15 мин при 16000 g. В супернатанте определяли содержание цАМФ.

Содержание цАМФ определяли, используя биохимический набор («Алга», Ленинград). Метод определения содержания цАМФ основан на конкурентном связывании немеченного и определенного количества меченного тритием цАМФ циклонуклеотидсвязывающим белком, который представляет собой регуляторную субъединицу цАМФ-зависимой протеникиназы. Связанный с белком цАМФ осаждали сульфатом аммония (80% насыщения) и в осадке определяли радиоактивность и соответствующее количество цАМФ.

Для выявления влияния экстракта на активность аденилатциклазы образцы готовили следующим образом: к гомогенату (1 мл) добавляли АТФ-регенерирующую систему, состоящую из креатинфосфата и креатинкиназы, АТФ, ингибитор фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, а также экстракт в качестве эффектора в концентрации 0,5 и 1,0 мг/мл. В случае определения базальной активности аденилатциклазы в инкубационную смесь вместо экстракта добавляли соответствующий объем дистиллированной воды. Реакционную смесь инкубировали в водяной бане (30°C) при непрерывном перемешивании в течение 15 мин. Реакцию останавливали кипячением в течение 2 мин. Содержание цАМФ определяли как указано выше.

Результаты и обсуждение

Проведенные нами исследования показали, что экстракт *Bryonia alba* вызывает увеличение уровня цАМФ дозозависимым образом. Зависимость имеет колоколообразный характер с максимальным уровнем цАМФ, соответствующим концентрации экстракта 1 мг/мл. В этой точке превышение уровня цАМФ над контрольным значением составляет 62%. С дальнейшим увеличением концентрации экстракта в инкубационной смеси эффект постепенно снижается.

Исследуемый экстракт содержит ряд физиологически активных соединений, в том числе и некоторые жирные кислоты [15]. С целью выяснения участия фракции жирных кислот в наблюдаемом эффекте мы экстрагировали жирные кислоты трижды равными объемами хлороформа и этилового эфира последовательно каждый раз в течение 5 минут. Результаты исследования влияния полученного экстракта на уровень цАМФ практически не отличались от уровня цАМФ в случае использования исходного экстракта (данные не приведены). Таким образом, можно заключить, что фракция жирных кислот, содержащаяся в экстракте *Bryonia alba*, не оказывает заметного влияния на образование цАМФ.

Используя максимально эффективную для случая дозозависимой кривой концентрацию экстракта, равную 1 мг/мл, мы провели исследование временной зависимости влияния экстракта *Bryonia alba* на уровень цАМФ. Установлено, что временная зависимость имеет два четко выраженных пика, один из которых соответствует одной минуте инкубации, а другой — тридцати минутам инкубации, что является характерным для временной зависимости влияния ряда гормонов и нейротрансмиттеров на уровень циклического АМФ [3, 11]. Наблюдаемое действие экстракта на уровень цАМФ может быть обусловлено либо стимулированием активности аденилатциклазы, либо ингибированием активности фосфодиэстеразы циклических нуклеоти-

дов. Для выяснения механизма наблюдаемого эффекта мы исследовали активность аденилатциклазы под влиянием экстракта *Bryonia alba* в присутствии ингибитора фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов. Результаты этих экспериментов суммированы в таблице.

Влияние экстракта *Bryonia alba* на активность аденилатциклазы головного мозга белых крыс ($p < 0,05$)

Содержание эксперимента	Активность аденилатциклазы пмоль цАМФ/мг белка·мин ⁻¹	Процент стимуляции
Контроль	14,36 ± 0,14	—
Экстракт 0,5 мг/мл	32,2 ± 1,45	125
Экстракт, 1,0 мг/мл	21,53 ± 1,55	70

Исходя из того, что в инкубационной смеси присутствовал ингибитор фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, а также учитывая вышеприведенные данные, можно заключить, что экстракт *Bryonia alba* в концентрациях 0,5 и 1,0 мг/мл стимулирует активность аденилатциклазы головного мозга крыс в 2,25 и 1,7 раза соответственно. Подобное действие экстракта обусловлено, возможно, присутствием в нем таких соединений как тригидроксиоктадекадиеновые кислоты, проявляющие простагландиноподобную активность, а также гликозиды кукурбитацинов, имеющие структурное сходство с глюкокортико-стероидами.

Действие цАМФ в эукариотических системах опосредуется через цАМФ-зависимые протеинкиназы [10], которые играют ключевую роль в регуляции клеточной активности [7, 9, 13, 14]. В настоящее время нами продолжаются исследования по изучению молекулярных механизмов действия экстракта на различные метаболические процессы, происходящие как в клетке, так и в организме в целом, наряду с выявлением наиболее активных фракций, содержащихся в экстракте *Bryonia alba*.

Институт биохимии
АН Республики Армения

Поступила 10/VII 1991 г.

Ա. Գ. Ազիզյան, Ն. Վ. Քաչաթյան

Bryonia alba-ի ԵԶՎԱՄՔԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳԼՈՒԴԵՂԻ ՑԻԿԼԻԿ ԱՄՖ-Ի ՔԱՏԱՎՈՐՔԱՆ ՆՎ ԱՐԵՆԿԱՑՑԻՎԱԾԻ ԱԿՏԻՎՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Bryonia alba-ի մզվածքի ազդեցության մեխանիզմի մեջ ցիկլիկ նուկլեոտիդների դերի պարզաբանման նպատակով ուսումնասիրված է նրա ազդեցությունը սպիտակ առնետների գլխուղեղի ցիկլիկ ԱՄՖ-ի քանակության և ադենիլատցիկլազի ակտիվության վրա: Ցույց է տրված, որ մզվածքը ավելացնում է ուղեղային հյուսվածքի ցիկլիկ ԱՄՖ-ի քանակը, ընդ որում առավել ավելացում (62 %) դիտվում է 1,0 մզ/մլ մզվածքի օգտագործման դեպքում: Ժամանակային կախվածության կորը ունի երկու գագաթ, որոնք համապատասխանում են ինկուբացիայի 1 և 30 րոպեներին: Այդպիսի պատկերը հատկանշական է ցիկլիկ ԱՄՖ-ի մակարդակի վրա մի շարք հորմոնների և նեյրոտրանսմիտերների ազդեցության պատկերի համար:

Մզվածքի 0,5 և 1,0 մգ/մլ կոնցենտրացիայի օգտագործման դեպքում ադենիլատցիկլազայի ակտիվությունը համապատասխանաբար բարձրացնում է 70 և 125 %: Ստացված տվյալները վկայում են այն մասին, որ *Bryonia alba*-ի ազդեցության մեխանիզմում կարևոր դեր ունեն ցիկլիկ նուկլեոտիդները:

A. G. Aprik'ian, N. V. Kocharian

Effect of the *Bryonia alba* L. Extract on the Brain Tissue cAMP Level and the Adenylate Cyclase Activity

It has been shown that *Bryonia alba* roots extract significantly increases the brain tissue cAMP level. The maximal increase was obtained by 1 mg/ml extract.

The plot of concentration dependence has two peaks corresponding to 1 and 30 min of incubation. Similar effect has been indicated from a number of hormones and neurotransmitters. 0,5 mg/ml extract stimulates the activity of adenylate cyclase by 70 and 125% respectively.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абу Али Ибн Сина. Канон врачебной науки. Кн. 2. Ташкент, 1982.
2. Амир-Довлат Амасиани. В кн.: Ненужное для неучей. М., 1990, с. 531.
3. Априкян А. Г. Тез. докл. III респ. конф. Достижения физ.-хим. биол. и биотехнол. Ереван, 1989, с. 21.
4. Априкян Г. В., Князян В. А., Гекчян К. Г. Тез. докл. Всесоюз. конф., посвящ. 90-летию Х. С. Кошоянца. М., 1990, с. 141.
5. Варданян С. А. В кн.: Попытки лечения опухолей в средневековой армянской медицине. Ереван, 1976, с. 27.
6. Ли С. Е., Добрякова А. И. В кн.: Новые данные об элеутерококке и других адаптогенах. Владивосток, 1981, с. 149.
7. Aprikian A. G., Nesterova M. V., Severin E. S. Biochem. Intern., 1988, 16, 601.
8. Burgal M., Jorda A., Grisolia S. J. Neurochem., 1982, 38, 1498.
9. Constantinou A. I., Squinto S. P., Jungmann R. A. Cell., 1985, 42, 429.
10. Kuo J. F. and Greengard P. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1979, 76, 5090.
11. Langan T. A. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1989, 61, 1276.
12. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
13. Nesterova M. V., Glukhov A. I. and Severin E. S. Mol. Cell. Biochem., 1982, 49, 53.
14. Nesterova M. V. and Severin E. S. Life Chem. Rep., 1987, 4, 391.
15. Panossian A. G., Avetissian G. M., Mnatsakanian V. A., Batrakov S. G., Vartanian S. A., Gabrielian E. S., Amroyan E. A. Planta med., 1981, 47, 17.
16. Scamon P., Padgett S. and Daly J. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1981, 78, 3363.

УДК 615.212.7:616.831

Л. С. Вартанян, Ж. С. Геворкян, А. С. Оганесян

ВЛИЯНИЕ КЕТАМИНА НА АКТИВНОСТЬ Na, К-АТФ-азы И ТРАНСМЕМБРАННЫЙ ПЕРЕНОС ГЛЮКОЗЫ В МОЗГОВОЙ ТКАНИ

Наши прежние исследования показали, что кетамин как в условиях *in vitro*, так и *in vivo* подавляет поглощение глюкозы мозговой тканью. С другой стороны, известно, что трансмембранный перенос глюкозы из межклеточной жидкости вовнутрь клетки является