

УДК 612-018+612.015+615.355

Э. С. Геворжян, Г. А. Паносян

### ДЕЙСТВИЕ НЕКОТОРЫХ ХОЛИНОЛИТИКОВ И ХОЛИНОМИМЕТИКОВ НА ГОРМОНАЛЬНУЮ ИНДУКЦИЮ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ

Изучалось действие холинолитиков / атропин, пентафен / и холиномиметиков / ареколин, карбахолин / на активность первичной и индуцированной гидрокортизоном холинэстераз сердца крыс как *in vivo*, так и *in vitro*. Показано, что атропин и пентафен подавляют активность фермента как в контроле, так и при индукции, а холиномиметики, наоборот, несколько стимулируют ее, причем эти изменения активности первичной и индуцированной холинэстераз выражены в одинаковой степени.

Эксперименты с применением пуромипина показывают, что стимулирующее действие ареколина на активность холинэстеразы не является результатом активации генетического аппарата клетки.

В предыдущих работах нами была обнаружена вызванная гидрокортизоном гормональная индукция холинэстеразы у высших животных /5, 6/. Исследование гормональной индукции фермента у высших организмов представляется чрезвычайно важным как с точки зрения выяснения механизмов внутриклеточной регуляции, так и изучения механизмов действия гормонов и их роли в регуляторных системах. Вместе с тем изучение индукции важных для нервной системы ферментов, одним из которых является холинэстераза, даст возможность исследовать взаимозависимость функционирования генетического аппарата клетки и нейроэндокринной деятельности организма. С этой точки зрения изучение действия холинолитических и холиномиметических препаратов на индукцию холинэстеразы представляет определенный интерес. Оно поможет также выяснить, действуют ли вышеуказанные фармакологические вещества на генетический аппарат клетки.

В литературе имеется немало работ, касающихся изучения действия различных фармакологических препаратов /холинолитиков, холиномиметиков и антихолинэстеразных веществ / на холинэстеразную активность в различных тканях у разных животных, которые позволяют заключить, что под действием холинолитиков и антихолинэстеразных

препаратов происходит, как правило, уменьшение уровня активности фермента /1, 2, 15, 16 /; в то время как холиномиметики или вовсе не действуют, или же несколько повышают холинэстеразную активность /8 /. Следует, однако, учесть, что как уменьшение, так и увеличение активности фермента колеблется в довольно широком диапазоне в зависимости от доз и вида применяемого препарата.

Целью настоящей работы является изучение влияния некоторых холинолитиков и холиномиметиков на гормональную индукцию холинэстеразы сердца крыс и выяснение механизма действия данных препаратов.

### Материал и методика

В работе использованы: гидрокортизон фирмы "Рихтер" /ВНР/, ацетилхолинхлорид /химфармзавод им. Карпова, Москва /, пуромидин (American Cyanamid Com, США), препараты атропина, пентафена, ареколина и карбахолина (отечественного производства).

Исследования проводили на крысах. Индукцию холинэстеразы вызывали путем подкожного введения гидрокортизона в дозе 5 мг/100 г веса животного. Животных забивали через 3-3,5 часа после введения гидрокортизона. Атропин (0,25 мг/100 г), пентафен (0,025 мг/100 г), ареколин (0,04 мг/100 г), карбахолин (0,05 мг/100 г) вводили животным внутривенно, а крыс декапитировали через 45 мин. после введения препарата. Для определения действия фармакологических препаратов на индуцированный фермент животным, получившим гидрокортизон, через каждые 45-50 мин. вводили холинолитик или холиномиметик и по истечении 3,5 часов их декапитировали. Контролем служили животные, не обработанные гормоном, но получившие холинолитик или холиномиметик вышеприведенным образом. Для определения действия фармакологических препаратов непосредственно на фермент *in vitro* атропин, пентафен, ареколин и карбахолин вводили в реакционную смесь, содержащую экстракт ткани, субстрат и буферную систему в трех концентрациях: равных, в 10 и 100 раз превышающих их концентрации *in vivo*. В опытах по действию пуромидина антибиотик (в концентрации 3,5 мг/100 г) вводили подкожно за час до инъекции атропина или ареколина.

После декапитации контрольных и опытных животных быстро извлекали сердце и готовили гомогенат. Приготовление гомогената и спектрофотометрическое определение холинэстеразной активности описаны ранее /6 /. Результаты экспериментов обрабатывались статистически.

### Результаты и обсуждение

Был поставлен ряд экспериментов по изучению действия холинолитиков атропина и пентафена на первичный и индуцированный фермент. На рис. 1 приведены данные, которые показывают, что как атропин, так и пентафен подавляют холинэстеразную активность сердца контрольных и получивших гидрокортизон животных, причем атропин уменьшает активность фермента у контрольных крыс на 30%, а индуцированная холинэстераза подавляется холинолитиком на 33%.

Пентафен также оказывает почти равное по степени действие на

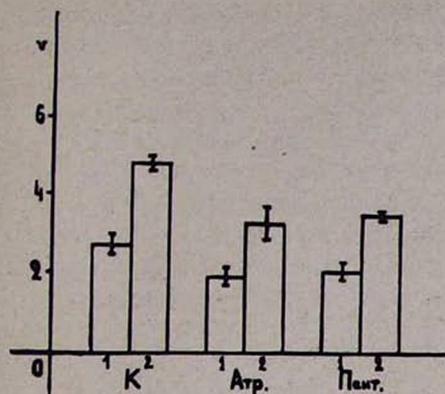


Рис. 1. Действие атропина и пентафена на первичную /1/ и индуцированную /2/ холинэстеразы. По оси ординат - скорость расщепления ацетилхолина (в  $\mu\text{M}/\text{мин.}$ ) К - контроль, Атр. - атропин, Пент. - пентафен.

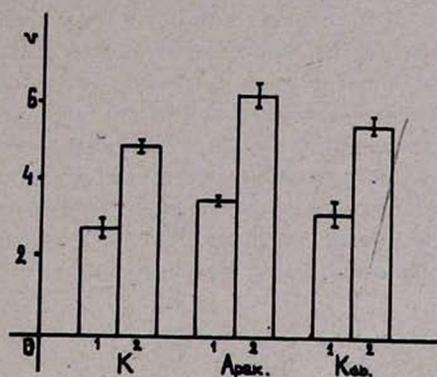


Рис. 2. Действие ареколина и карбахолина на первичную /1/ и индуцированную /2/ холинэстеразы. По оси ординат - скорость расщепления ацетилхолина (в  $\mu\text{M}/\text{мин.}$ ). К - контроль, Арек. - ареколин, Кар. - карбахолин.

первичный и индуцированный фермент, подавляя активность на 25-27%. Эти данные свидетельствуют об одинаковой чувствительности первичной и индуцированной холинэстераз к воздействию холинолитиков. О способности холинолитиков подавлять активность холинэстеразы свидетельствуют работы ряда авторов /7, 9, 10/, показавших, что атропин и некоторые другие холинолитики являются слабыми обратимыми конкурентными ингибиторами фермента. Результаты наших экспериментов хорошо согласуются с результатами работ А. Л. Мнджояна и сотр. /3, 4/, показавших, что холинолитики этпепал, ципенам, пентафен и их четвертичные аналоги подавляют активность холинэстеразы в различных отделах мозга и сердца крыс приблизительно на 30-40%, причем степень снижения активности в разных отделах тканей разная и зависит от дозы и вида применяемого препарата. Авторы показали также, что обратимые ингибиторы фермента эзерин и прозерин при их внутривенном введении сильнее тормозили активность фермента, чем холинолитики.

На рис. 2 представлены результаты экспериментов по изучению влияния холиномиметиков ареколина и карбахолина на первичный и индуцированный фермент. Результаты показывают, что оба препарата оказывают стимулирующий эффект. Так, ареколин увеличивает активность первичной и индуцированной холинэстераз на 28%, а карбахолин оказывает менее выраженное влияние, увеличивая активность первичного фермента на 15 и индуцированного фермента на 12%. Таким образом, эти эксперименты также свидетельствуют об идентичности каталитических свойств первичной и индуцированной холинэстераз.

Вышеуказанные эксперименты позволяют заключить, что холино-

литики атропин и пентафен подавляют активность холинэстеразы в контроле и при индукции, а холиномиметики, особенно ареколин, несколько увеличивают ее. Представляется интересным вопрос: являются ли эти изменения ферментативной активности результатом непосредственного действия фармакологических препаратов на молекулу фермента? Для выяснения этого были поставлены опыты по изучению действия холинолитиков и холиномиметиков на молекулу холинэстеразы *in vitro*. Исследования показали, что атропин и пентафен, непосредственно влияя на фермент *invitro*, резко уменьшали активность холинэстеразы, как первичной, так и индуцированной /рис. 3/, причем при высокой кон-

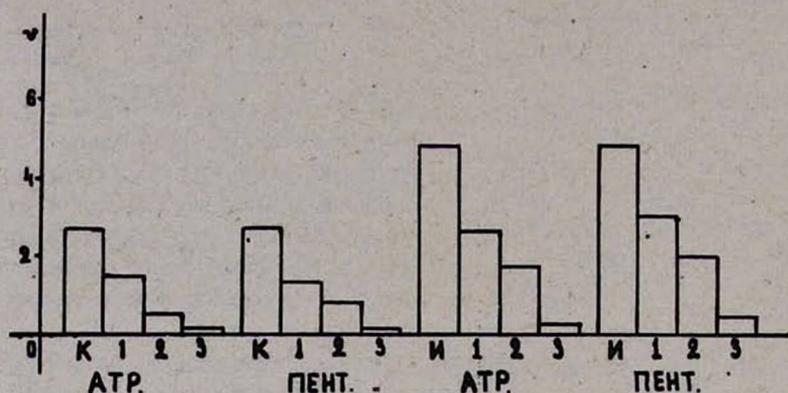


Рис. 3. Действие атропина и пентафена на активность холинэстеразы *invitro*. По оси ординат - скорость расщепления ацетилхолина (в  $\mu\text{M}/\text{мин}$ ). К - первичный фермент, И - индуцированный фермент. 1 - концентрации препаратов, равные их концентрациям *in vivo*, 2 и 3 - концентрации препаратов, в 10 и 100 раз превышающие их концентрации *in vivo*.

центрации холинолитиков активность фермента подавлялась почти полностью. Эти данные хорошо согласуются с литературными /3, 11, 12, 13, 14/, где также показано, что холинолитики уменьшают активность холинэстеразы *in vitro* опытах, непосредственно действуя на молекулу фермента. Среди этих работ интересными нам представляются исследования Като и сотр. /12, 13/, объясняющие механизм действия холинолитических препаратов, угнетающих холинэстеразную активность. На основании кинетических исследований взаимодействия эзерина и атропина с ацетилхолинэстеразой *in vitro* методом ЯМР авторы показали, что эзерин - активное потенциальное антихолинэстеразное вещество, а атропин - весьма слабое, и что эзерин ингибирует холинэстеразу, связываясь с ее каталитическим участком, а атропин уменьшает активность фермента, связываясь с участком, отличным от его активного центра. Было показано также, что участок на молекуле фермента, связывающий атропин, как и активный центр фермента, состоит из анионной области, однако последняя несколько отличается от анионной области активного центра холинэстеразы.

Как показывают исследования по влиянию ареколина и карбахолина *in vitro* на активность первичной и индуцированной холинэстераз, увеличение ферментативной активности является результатом непосредственного воздействия препаратов на молекулу фермента /рис. 4/.

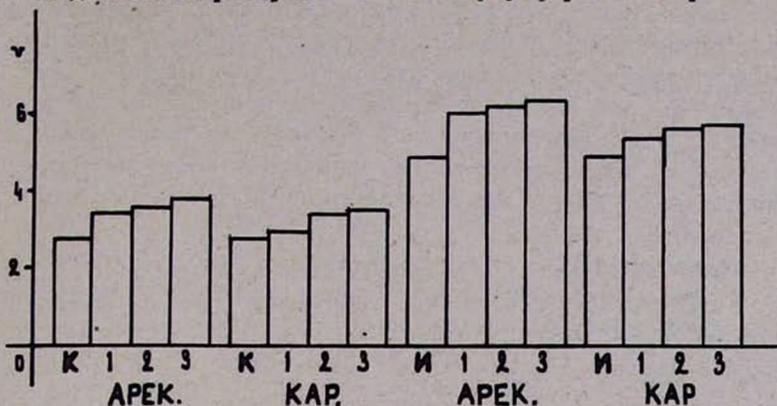


Рис. 4. Действие ареколина и карбахолина на активность холинэстеразы *in vitro*. По оси ординат - скорость расщепления ацетилхолина (в  $\mu\text{M}/\text{мин}$ ). К - первичный фермент, И - индуцированный фермент. 1 - концентрации препаратов, равные их концентрациям *in vivo*, 2 и 3 - концентрации препаратов, в 10 и 100 раз превышающие их концентрации *in vivo*.

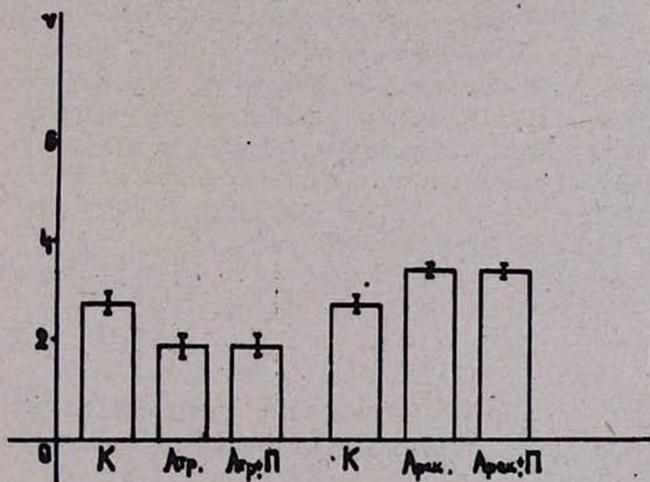


Рис. 5. Активность холинэстеразы при воздействии атропина и ареколина после предварительного введения пуромицина. По оси ординат - скорость расщепления ацетилхолина (в  $\mu\text{M}/\text{мин}$ ). К - контроль, Атр. - атропин, Арек. - ареколин, Атр.+П, Арек.+П - после предварительного введения пуромицина.

Исследования действия холинолитиков как *in vivo*, так и *in vitro* показывают, что данные фармакологические препараты, особенно ареколин, несколько стимулируют холинэстеразную активность

сердца крыс, что согласуется с результатами работ Э.Э.Юриссона /8/, показавшего, что ареколин увеличивает активность холинэстеразы, которая резко подавляется прозеринном и ацеклидином.

Для выяснения того, действуют ли данные холинолитики и холиномиметики на генетический аппарат клетки, нами были поставлены эксперименты по изучению влияния атропина и ареколина на активность холинэстеразы сердца крыс, предварительно получивших ингибитор синтеза белка – пуромидин /рис. 5/. Результаты показывают, что изменения ферментативной активности, вызванные холинолитиком и холиномиметиком, не являются следствием угнетения или активации синтеза холинэстеразы.

Как показано на рис. 5, предварительная обработка животных пуромидином не приводит к изменению влияния атропина и ареколина на активность холинэстеразы сердца крыс.

### В ы в о д ы

1. Холинолитики атропин и пентафен как в опытах *in vivo*, так и *in vitro* подавляют активность первичной и индуцированной холинэстераз почти в одинаковой степени, что свидетельствует об идентичности каталитических свойств первичного и индуцированного ферментов.

2. Холиномиметики ареколин и карбахалин как *in vivo*, так и *in vitro* несколько стимулируют активность холинэстеразы сердца крыс. Это стимулирование также выражено в одинаковой степени для первичного и индуцированного ферментов.

3. Ингибитор синтеза белка пуромидин не оказывает никакого влияния на изменения холинэстеразной активности, вызванные атропином и ареколином. Это свидетельствует о том, что данные фармакологические препараты не действуют на генетический аппарат клетки.

Кафедра биофизики Ереванского  
государственного университета

Поступила 13/У 1973г.

Է. Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ՄԻ ՇԱՐՔ ԽՈՒԼԻՆՈԼԻՏԻԿՆԵՐԻ ԵՎ ԽՈԼԻՆՈՄԻՄԵՏԻԿՆԵՐԻ  
ԱԶԳԻՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԽՈԼԻՆԷՍԹԵՐԱԶԻ ՀՈՐՄՈՆԱԼ ԻՆՎՈԿԱՑԻՎԱՅԻ ՎՐԱ

### Ա մ փ օ փ օ մ

Ուսումնասիրված է խոլինոլիտիկների (ատրոպին, պենտաֆեն) և խոլինոմիմետիկների (արեկոլին, կարբախոլին) ազդեցությունը *in vivo* և *in vitro* առնետի սրտի առաջնային (կոնտրոլ) և ինդուկցված խոլինէսթերազների ակտիվության վրա: Ցույց է տրված, որ ատրոպինը և պենտաֆենը իջեցնում են ինչպես առաջնային, այնպես էլ հորմոնով ինդուկցված ֆերմենտի ակտիվության մակարդակը, իսկ արեկոլինը և կարբախոլինը, ընդհակառակը, փոքրինչ բարձրացնում են այն, ընդ որում, խոլինէսթերազի ակտիվության փո-

փոխութիւնները հավասարապես են արտահայտված կոնտրոլ և ինդուկցված ֆերմենտների համար: Փորձերի հիման վրա եզրակացութիւն է արվում առաջնային ինդուկցված խոլինէսթերազների կատալիտիկ հատկութիւնների միանմանութեան մասին:

Պոլրոմիցինով կատարված փորձերը ցույց են տալիս, որ արեկոլինի ֆերմենտի ակտիվութեան խթանումը բջի գենետիկական ապարատի ակտիվացման հետևանք չէ:

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Амадян М.Г. Изв. АН Арм. ССР (биол. науки), 1963, 16, стр. 13.
2. Амадян М.Г. Сб.: Структура и функция нервной системы. М., 1965, стр. 133.
3. Мнджоян А. Л., Амадян М.Г. Биологич. ж. Армении, 1970, 23 5, стр. 3.
4. Мнджоян А. Л., Амадян М.Г., Ширинян Е. А., Цовянова С. Т. Биологич. ж. Армении, 1970, 23, 1, стр. 3.
5. Паносян Г. А., Геворкян Э. С., Даниелян Т. С. Тез. докл. Всес. конф., посв. 70-летию Х. С. Коштоянца. Ереван, 1971.
6. Паносян Г. А., Геворкян Э. С., Даниелян Т. С., Назарян К. Б. Биологич. ж. Армении, 1972, 25, 2, стр. 40.
7. Пономаренко Л. Н. Сб.: Вопросы энзимопатологии. М., 1964.
8. Юриссон Э. Э. Сб.: Материалы XI науч. конф. по фарм. и токсикол., ч. 2. М., 1970, стр. 209.
9. Ashford A., Penn G. B.; Ross Janet W. Nature, 193, 4820, 1082, 1962.
10. Chadwick L. E. J. Insect. Physiol., 10, 4, 573, 1964.
11. Kato G. Mol. Pharmacol., 8, 5, 575, 1972.
12. Kato G., Yung J., Ihnat M. Biochem. Biophys. Res. Commun., 40, 1, 15, 1970.
13. Kato G., Yung J., Ihnat M. Mol. Pharmacol., 6, 16, 588, 1970.
14. Kato G., Tan E., Yung J. J. Biol. Chem., 247, 10, 3186, 1972.
15. Patočka J. Cs. farm., 20, 9, 374, 1971.
16. Rump S. Post. hig. i med. dosw., 26, 2, 225, 1972.