

циональное и интеллектуально-мнестическое состояние, а также усиливать работоспособность в условиях повышенного напряжения, усталости, действия острых астенизирующих и других экстремальных факторов связано с оптимизацией адаптивной и энергетической функций ГАМК-системы мозга.

ЛИТЕРАТУРА

1. Андреев Б. В., Игнатов Ю. Д., Никитина З. С., Сытинский И. А. // Журн. высш. нервн. деят. — 1982. — № 3. — С. 511—519.
2. Андреев Б. В., Галустьян Г. Э., Игнатов Ю. Д. и др. // Укр. биохим. журн. — 1983. — № 6. — С. 652—656.
3. Богачев Н. А. // Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов. — Волгоград, 1985. — С. 93—98.
4. Ковалев Г. В., Спасов А. А., Богачев Н. А. // Новые данные об элеутерококке и других адаптогенах. — Владивосток, 1981. — С. 51—56.
5. Ковалев Г. В., Гурбанов К. Г., Тюренков И. Н. // Фармакол. и токсикол. — 1983. — № 3. — С. 41—44.
6. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии. — М., 1980. — С. 224—226.
7. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М., 1984.
8. Мехилане Л. С., Васар В. Э. // Механизм действия и клиника производных гамма-аминомасляной кислоты. — Тарту, 1984. — С. 112—123.
9. Панков Ю. М., Усватова И. Я. // Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. — М., 1973. — С. 66—70.
10. Раевский К. С. // Фармакол. и токсикол. — 1981. — № 5. — С. 517—529.
11. Спасов А. А., Островский О. В. // Фармакология и клиническое применение нейроактивных аминокислот и их аналогов. — Волгоград, 1985. — С. 34—38.
12. Хайдарлиу С. Х. Функциональная биохимия адаптации. — Кишинев, 1984.
13. De Boer T., Bruinvels J. // J. Neurochem. — 1977. — Vol. 28. — P. 471—478.
14. Hennessy M. B., Heybach J. P., Vernikos J., Levine S. // Physiol. Behav. — 1979. — Vol. 22. — P. 821—825.
15. Lowe I. P., Robins E., Eyreman G. S. // J. Neurochem. — 1958. — Vol. 3. — P. 8—18.
16. Sayers G. // Physiol. Rev. — 1950. — Vol. 30. — P. 241—320.

Поступила 17.06.86

THE ROLE OF GABA-ERGIC SYSTEM IN THE MECHANISM OF STRESS-REGULATING PHENIBUTE EFFECT

G. V. Kovalev, A. A. Spasov, N. A. Bogachev, V. D. Petryanik, O. V. Ostrovsky

Disturbances in GABA-ergic inhibitory system were noted upon the exposure of thalamus and hypothalamus of experimental animals to stress of 18 hours and longer duration but not of 3 hours duration. Phenibute (1 mg/kg) eliminates the symptoms of GABA-system disturbances revealed upon exposure to stress, decreases the tension of stress reaction and hyperglucocorticoidemia which causes hyperglycemia. In the bodies of intact rats phenibute causes "switching on" of adaptive GABA-system function, which is more physiological than the one appearing on short-term stress.

УДК 612.111.7.015:577.152.633]:615.21.3.07

Ключевые слова: β -адренорецептор, аденилатциклаза, ретикулоциты, тиопроперазин, гриф-луперидол

Г. С. Куренная, Е. Е. Чекнева, Г. Ю. Григорян, В. А. Ткачук

β -АДРЕНЕРГИЧЕСКИЙ РЕЦЕПТОР И АДЕНИЛАТЦИКЛАЗА РЕТИКУЛОЦИТОВ КРЫСЫ КАК ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ СКРИНИНГА ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

Институт экспериментальной кардиологии ВКНЦ АМН СССР, Москва

Представлена акад. АМН СССР В. Н. Смирновым

Создание высокоспецифических препаратов связано с необходимостью разработки тест-систем, адекватно отражающих механизм действия данного вещества. Первичным преемником сигнала нейрогуморальных стимулов в организме, а также мишенью значительного количества лекарственных средств является аденилатциклазная система [2]. Этот трансмембранный олигомерный комплекс состоит из гормональных рецепторов, ГТФ-связывающих белков двух типов (активаторного и ингибиторного) и собственно каталитической субъединицы аденилатциклазы — АЦ [1]. Тот факт, что β -адренергические рецепторы взаимодействуют с АЦ-системой [1, 2] позволяет, используя один и тот же препарат мембран, измерять и связывание лиганда с рецепторами, и активность АЦ, изменяющуюся в присутствии лиганда.

В данной работе предлагается биохимическая тест-система для фармакологического скрининга физиологически активных веществ, влияющих на β -адренергические рецепторы.

Методика исследования. Индукцию ретикулоцитоза проводили с некоторыми модификациями, как описано в работах [4, 11]. Крысам (самцы массой около 300 г) линии Вистар вводили фенилгидразин (однократные инъекции подкожно в концентрации 36 мг/мл по 0,5 мл) в течение 3 дней. Крысу усыпляли эфиром или хлороформом, фиксировали, вскрывали грудную клетку. Брали кровь непосредственно из сердца шприцем, в котором находилось 2 мл антикоагулянта: 5 мМ ЭДТА с раствором 0,9 % NaCl. Кровь центрифугировали 4 раза по 5 мин при 1500—2000 g, осторожно отбирая надосадочную жидкость. Осадок клеток лизировали раствором, содержащим 30 мМ трис-HCl pH 7,5, 1 мМ диэтиленetriола и 0,5 мМ ЭДТА, при отношении лизирующего раствора к осадку 1:10 (1:15). Лизат стоял 30 мин, затем его гомогенизировали с помощью гомогенизатора стекло-тефлон. Полученную суспензию центрифугировали при 14 000 g 30 мин. Осадок дважды промывали ли-

зирующим раствором. Последний раз центрифугирование проводили в растворе, содержащем 30 мМ трис-НСl pH 7,5 и 0,25 М сахарозы. Мембраны суспендировали в указанном растворе и хранили при температуре жидкого азота. Концентрация белка в полученных мембранах была равна 8 мг/мл. Активность АЦ измеряли, как описано в работе [7]. Мембранный препарат (5—50 мкг белка) инкубировали в течение 20 мин при 30 °С в 50 мкл инкубационной среды следующего состава: 50 мМ трис-НСl pH 7,5 при 30 °С, 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ цАМФ, 0,5 мМ изобутилметилксантина, 0,1 мМ АТФ, (α -³²P (-АТФ) 0,5 мКи в пробе) фирмы «Amersham» (Англия), 20 мМ креатинфосфата, 0,2 мг/мл креатинфосфокиназы. Все значения активности АЦ представляют собой среднюю величину из трех параллельных измерений.

Связывание (—)-[³H]-дигидроалprenолола (ДГА) с β -адренергическими рецепторами ретикулоцитов определяли, как описано в работе [8], с некоторыми модификациями. Инкубацию мембран (25 мкг в пробе) с ДГА (40 нМ) проводили в среде общим объемом 1 мл, содержащей 20 мМ трис-НСl pH 7,5, при 4° С, 5 мМ MgCl₂, с последующей фильтрацией под вакуумом через фильтры типа GF/C («Whatman», Англия). Фильтры высушивали, помещали во флаконы со сцинтилляционной жидкостью и измеряли радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике. Для определения неспецифического связывания в специальные пробы добавляли (—)-пропранолол в концентрации 10⁻⁵ М. Специфическое связывание ДГА с β -адренергическими рецепторами определяли путем вычитания неспецифического связывания из общего. Вычисление K_i и количества рецепторов проводили по методу [14], используя программу для линейной регрессии на микрокалькуляторе HP-67 («Hewlett—Packard», США). Содержание белка определяли по [12].

Результаты исследования. Ретикулоциты в отличие от зрелых эритроцитов имеют гормончувствительную АЦ [11]. Для обогащения крови крыс ретикулоцитами мы использовали фенилгидразин, вызывающий ретикулоцитоз [6]. Из литературы известно, что ретикулоциты крысы содержат только один β_2 -подтип адренергиче-

ских рецепторов [9]. Кроме того, отсутствуют данные о наличии у ретикулоцитов α -адренорецепторов. Регуляторные свойства полученного нами препарата АЦ практически не отличались от описанных в литературе [13] (табл. 1). По нашим данным, ГТФ практически не влиял на активность АЦ, а ГИДФ увеличивал ее активность приблизительно в 13 раз. Изопротеренол в концентрации 5·10⁻⁵ М активировал АЦ приблизительно в 13 раз. Добавление гормона вместе с гуаниловыми нуклеотидами приводило к резкой активации АЦ, степень ее активации возрастала до 40-кратной (см. табл. 1).

Из исследованного ряда кардио- и нейротропных средств (табл. 2) ингибирующее действие на базальную активность АЦ оказывали метафеназин и тиопроперазин (производные фенотиазина). Однако на гормональную стимуляцию АЦ изопротеренолом (табл. 3) блокирующий эффект обнаружили тиопроперазин (вещество фенотиазинового ряда) и трифлуперидол (производное бутирофенона). Метафеназин не оказывал влияния на гормональную чувствительность АЦ (см. табл. 3). Факт ингибирования базальной активности АЦ метафеназином и тиопроперазином можно объяснить наличием неспецифического мембранного эффекта при действии этих веществ в высокой концентрации.

Кроме фармакологических препаратов, указанных в табл. 3, исследовали (+)- и (—)-изомеры бутакламола, а также имипрамин, винбластин, верапамил. Эти вещества в концентрации 10⁻⁴ М не влияли на чувствительность АЦ к изопротеренолу, хотя незначительно ингибировали базальную активность АЦ.

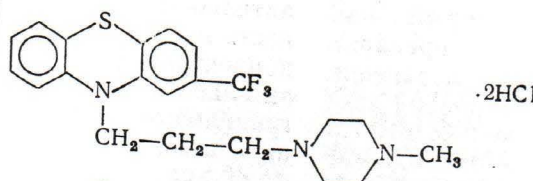
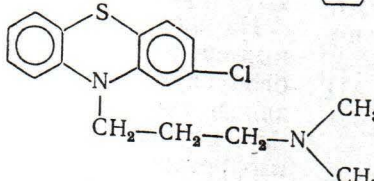
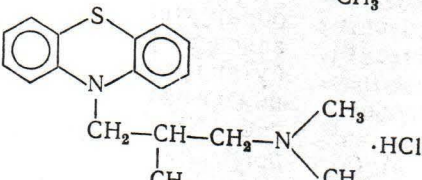
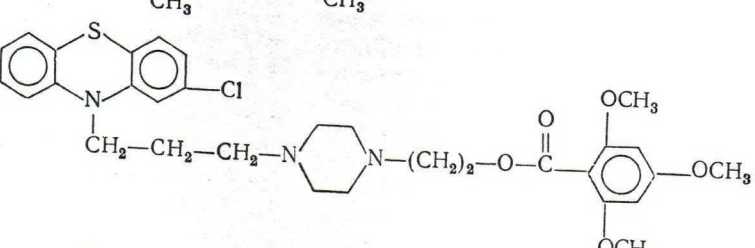
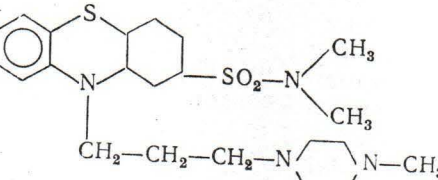
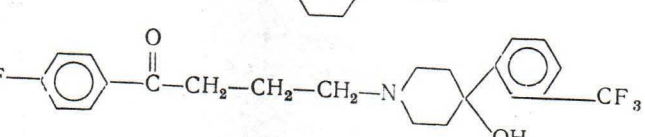
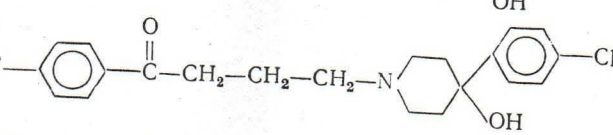
Мы определяли константы полумаксимального ингибирования (IC₅₀) изопротеренолстимулированной АЦ, для тиопроперазина IC₅₀ = 5,62·10⁻⁵ М (см. табл. 3) и для трифлуперидола IC₅₀ = 4,64·10⁻⁵ М (см. табл. 3). Для более подробного изучения механизма ингибирования исследовали их влияние на стимуляцию АЦ изопротеренолом при двух концентрациях блокаторов. Оказалось (рис. 1, а), что при действии тиопроперазина в концентрации 5·10⁻⁵ М кривая активации АЦ гормоном сдвигается вправо. При концентрации 10⁻⁴ М наблюдается значительный сдвиг кривой с уменьшением степени активации АЦ изопротеренолом. Преобразование этих данных в координатах Диксона (см. рис. 1, б) позволило определить константу ингибирования гормонстимулируемой активности АЦ для тиопроперазина, равную K_i = 4,0·10⁻⁵ М. Аналогичные исследования мы проводили для трифлуперидола. Это соединение также уменьшало сродство β -рецептора к изопротеренолу (рис. 2, а) и снижало степень активации АЦ гормоном. Определяемая методом Диксона, константа ингибирования равна 4,5·10⁻⁴ М (см. рис. 2, б). На основании результатов проведенных экспериментов можно было предположить блокирующее влияние тиопропера-

Таблица 1
Регуляторные свойства АЦ мембран ретикулоцитов крысы (M ± m)

Условия опыта	Активность АЦ, пмоль цАМФ на 1 мг белка в 1 мин	Степень активации
Контроль	4,5±0,5	1
ГТФ, 10 ⁻⁴ М	4,0±0,4	1
ГИДФ, 10 ⁻⁴ М	58,0±5	13
ИЗО, 5·10 ⁻⁵ М	57,0±5	12,6
ИЗО + ГТФ	208,5±15	44
ИЗО + ГИДФ	189,0±10	42

Влияние ряда фармакологических препаратов на базальную активность АЦ ретикулоцитов крысы ($M \pm m$)

Таблица 2

Фармакологический препарат, 10^{-4} М	Структурная формула	Базальная активность, %
Контроль		100
Фенотиазины:		
трифлуперазин		78 ± 15
хлорпромазин		95 ± 13
левопромазин (тизерцин)		93 ± 9
метафеназин (френолон)		49 ± 4
тиопроперазин (мажептил)		49 ± 7
Бутирофеноны:		
трифлуперидол (триседил)		75 ± 7
галоперидол		68 ± 4

Примечание. Реакцию проводили при 30°C в течение 15 мин. Среда инкубации содержала 50 мМ трис-НСl рН 7,5, 5 мМ MgCl_2 , 0,5 мМ цАМФ, 0,1 мМ АТФ, 0,5 мкКи $[\alpha = ^{32}\text{P}] = \text{АТФ}$, 10^{-4} ГТФ и АТФ-регенерирующую систему.

зина и трифлуоперазина на β -адренергический рецептор, сопряженный с АЦ. Влияние этих соединений на каталитическую субъединицу отсутствовало (не было действия на базальную активность фермента). Оставалось предполагать, что эти два соединения либо влияют непосредственно на β -адренергический рецептор ретикулоци-

тов, либо нарушают процесс сопряжения рецептора с АЦ.

Прямое доказательство β -блокирующего действия тиопроперазина и трифлуперидола на β -адренорецепторы мы получили при изучении действия этих препаратов на связывание ДГА с мембранами ретикулоцитов (рис. 3). Оба веще-

Таблица 3
Влияние ряда фармакологических препаратов на изопротеренолстимулируемую активность АЦ ретикулоцитов ($M \pm m$)

Фармакологический препарат (10^{-4} М)	Активация АЦ при $3 \cdot 10^{-6}$ М ИЗО, * %	IC_{50} , мкМ
Контроль ИЗО $3 \cdot 10^{-6}$ М	100	—
Фенотиазины:		
трифлуперазин	80 ± 16	>100
хлорпромазин	73 ± 13	>100
левомепромазин (тизерцин)	79 ± 8	>100
метафеназин (френолон)	128 ± 19	—
тиопроперазин (мажептил)	24 ± 4	56,2
Бутирофеноны:		
трифлуперидол (триседил)	30 ± 2	46,4
галоперидол	89 ± 12	>100

Примечание. Реакцию проводили при 30°C в течение 15 мин. Среда инкубации содержала 50 мМ трис-НСI pH 7,5, 5 мМ $MgCl_2$, 0,1 мМ АТФ, 0,5 мкКи $[\alpha-^{32}P]$ -АТФ, 0,5 мМ цАМФ, 10^{-4} ГТФ, $3 \cdot 10^{-6}$ М изопротеренола и АТФ-регенерирующую систему. Звездочка — активность АЦ + ИЗО $\times 100\%$ в присутствии (или без) фармакологического препарата.

ства практически одинаково вытесняли меченый лиганд с константой полумаксимального вытеснения $IC_{50} = 1,3 \cdot 10^{-5}$ М для тиопроперазина и $IC_{50} = 2,3 \cdot 10^{-5}$ М для трифлуперидола. Методом Ченга — Пруссова мы вычисляли и константы ингибирования связывания лиганда для этих веществ. $K_i = 5 \cdot 10^{-6}$ М для тиопроперазина и $K_i = 9 \cdot 10^{-6}$ М для трифлуперидола. В пределах одного порядка константы ингибирования гормональной чувствительности АЦ совпадают с константами вытеснения меченого лиганда. На основании полученных нами данных можно предположить, что биологический эффект, обусловлен-

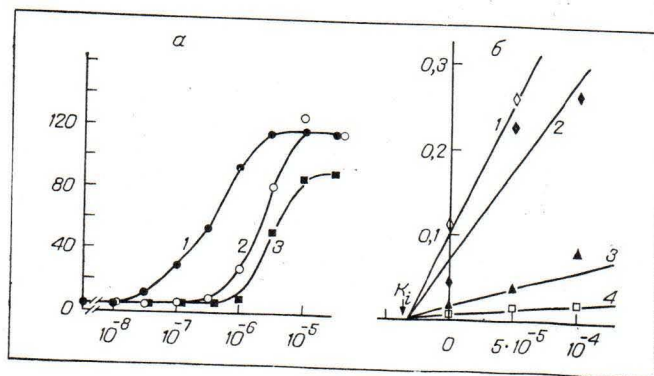


Рис. 1. Влияние тиопроперазина на изопротеренолстимулируемую активность АЦ ретикулоцитов (А) и обработку данных в координатах Диксона (Б).

а: по оси абсцисс — концентрация изопротеренола, М, по оси ординат — активность АЦ, пмоль цАМФ на 1 мг белка в 1 мин. 1 — без добавок, 2 — в присутствии $5 \cdot 10^{-5}$ М тиопроперазина, 3 — в присутствии 10^{-4} М тиопроперазина; б: по оси абсцисс — концентрация тиопроперазина, М, по оси ординат — отношение активности АЦ в присутствии тиопроперазина к активности АЦ без добавок при концентрации изопротеренола $3 \cdot 10^{-8}$ М (1), 10^{-7} М (2), 10^{-6} М (3), $3 \cdot 10^{-6}$ М (4). $K_i = 4,01 \cdot 10^{-6}$ М.

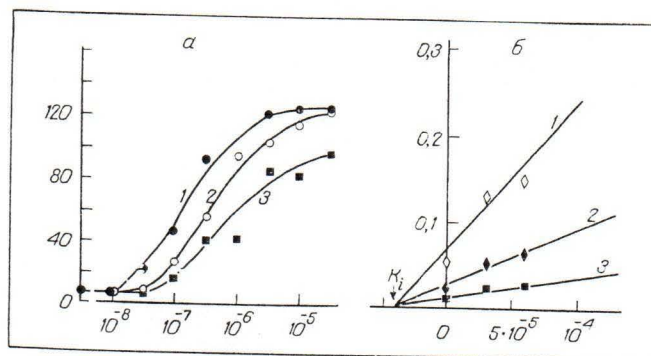


Рис. 2. Влияние трифлуперидола на изопротеренолстимулируемую активность АЦ ретикулоцитов (а) и обработка данных в координатах Диксона (б).

1 — без добавок, 2 — в присутствии $3 \cdot 10^{-5}$ М трифлуперидола, 3 — в присутствии $6 \cdot 10^{-5}$ М трифлуперидола; б: по оси абсцисс — концентрация трифлуперидола, М; по оси ординат — отношение активности АЦ в присутствии трифлуперидола к активности АЦ без добавок при концентрации изопротеренола $3 \cdot 10^{-8}$ М (1), 10^{-7} М (2), $3 \cdot 10^{-6}$ М (3). $K_i = 4,5 \cdot 10^{-6}$ М.

ный изменением активности изопротеренолстимулируемой АЦ, связан с прямым действием тиопроперазина и трифлуперидола на β -адренергические рецепторы.

До настоящего времени в литературе не было прямых доказательств β -блокирующего эффекта производных бутирофенола. Нам удалось прямо продемонстрировать имевшиеся ранее косвенные данные об адренолитических свойствах тиопроперазина [8]. Обнаруженный нами β -блокирующий эффект трифлуперидола свидетельствует об эффективности использования препарата мембран ретикулоцитов крысы в качестве биохимической тест-системы для оценки влияния лекарственных веществ на β -адренергический рецептор, сопряженный с АЦ. Константы сродства тиопроперазина к трифлуперидолу на три поряд-

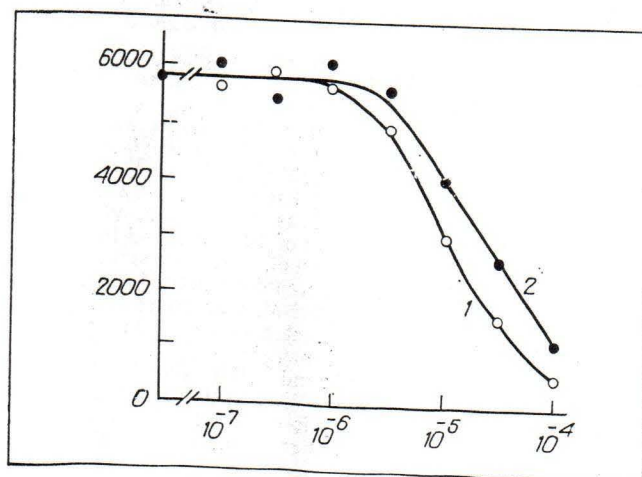


Рис. 3. Вытеснение $[^3H]$ -дигидроальпrenoла, связанного с β -рецепторами ретикулоцитов крысы, тиопроперазином (1) и трифлуперидолом (2).

По оси абсцисс — концентрация веществ (в М) в логарифмической шкале, по оси ординат — специфическое связывание $[^3H]$ -дигидроальпrenoла, в дпм.

ка ниже, чем у известных β -блокаторов пропранолола и альпренолола [3], однако применяемые в клинике дозировки этих лекарственных соединений дают основание предполагать, что адренотическое действие трифлуперидола и тиопроперазина может играть существенную роль в проявлении их побочных эффектов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воейков В. Л. Итоги науки и техники: Сер. Биоорганическая химия. — М., 1984. — Т. 2.
2. Ткачук В. А. Введение в молекулярную эндокринологию. — М., 1983.
3. Brown E. M., Gardner J. D., Aurbach G. D. // *Endocrinology*. — 1976. — Vol. 99. — P. 1370.
4. Cooper D., Jagus R. // *J. biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257. — P. 4684.
5. Furchgott R. F. // *Fed. Proc.* — 1978. — Vol. 37. — P. 115.
6. Gauger D., Palm D. // *Life Sci.* — 1973. — Vol. 13. — P. 31.
7. Grigorian G. Yu., Tkachuk V. A. // *Biochem. int.* — 1982. — Vol. 4. — P. 595.
8. Janssen P. A. J., Van Bever W. F. M. // *Handbook of Psychopharmacology: Neuroleptics and Schizophrenia*. — New York, 1978. — Vol. 10. — P. 1.
9. Lands A. M., Arnold A., McAuliff J. P. et al. // *Nature*. — 1967. — Vol. 214. — P. 597.
10. Lefkowitz R. J., Mullikin D., Caron M. // *J. biol. Chem.* — 1976. — Vol. 251. — P. 4686.
11. Limbird L. E., Gill M. // *Ibid.* — 1980. — Vol. 255. — P. 1854.
12. Peterson G. L. // *Analyt. Biochem.* — 1977. — Vol. 83. — P. 346.
13. Ross E., Gilman A. G. // *Biochemical Regulation of Blood Pressure* / Ed. R. L. Soffer, 1981.
14. Scatchard G. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* — 1949. — Vol. 51. — P. 660.

Поступила 21.01.87

β -ADRENERGIC RECEPTOR AND ADENYLATE CYCLASE OF RAT RETICULOCYTES AS A TEST-SYSTEM FOR DRUG SCREENING

G. S. Kurennaya, E. E. Chekneva, G. Yu. Grigoryan, V. A. Tkachuk

USSR Cardiology Research Centre, Academy of Medical Sciences of the USSR, Moscow

The effect of cardio- and neurotropic drugs was studied on β_2 -adrenergic receptors and coupled adenylate cyclase (AC) from rat reticulocytes. Trifluoperazine, chlorpromazine, levomepromazine, metapromazine, haloperidol, (+) and (—) isomers of butaclamol, as well as imipramine, vinblastine and verapamil, at a concentration of 10^{-4} M failed to influence AC stimulation by isoproterenol. Thioproperazine and trifluoperidol inhibited isoproterenol-stimulated AC with $K_i = 4.0 \cdot 10^{-5}$ M and $K_i = 4.5 \cdot 10^{-5}$ M, respectively. This inhibitory effect was due to the direct action of thioproperazine and trifluoperidol on the β -adrenergic receptors, since these drugs displace the receptor-bound (3 H) dihydroalprenolol with $K_i = 5 \cdot 10^{-6}$ M and $9 \cdot 10^{-6}$ M, respectively. The results obtained suggest that adrenergic effect of trifluoperidol and thioproperazine might play a significant role in their side effects.

УДК 615.224:547.869.2].015.4:[612.173.1.015.1:577.152.633

Ключевые слова: аденилатциклаза, β -адренорецепторы, миокард, нонахлазин, ишемическая болезнь сердца

Е. Г. Бруслова, Г. Н. Балденков

ВЛИЯНИЕ НОНАХЛАЗИНА НА АДЕНИЛАТЦИКЛАЗНУЮ СИСТЕМУ СЕРДЦА КРОЛИКА

Лаборатория фармакологии кровообращения (руководитель — доктор мед. наук проф. Н. В. Каверина) НИИ фармакологии АМН СССР, лаборатория молекулярной эндокринологии (руководитель — доктор биол. наук В. А. Ткачук) ВКНЦ АМН СССР, Москва

Представлена акад. АМН СССР А. В. Вальдманом

Созданный в Институте фармакологии АМН СССР препарат нонахлазин — дихлоргидрат 10- β -[1,4-дизаобицикло-(4, 3, 0)-нонанил 4]-пропионил-2-хлорфенатазина — применяют для лечения ишемической болезни сердца. Фармакологические свойства нонахлазина были подробно исследованы [1]. Изучение влияния нонахлазина на деятельность сердца (сердечный выброс, сократительная функция) показало, что это соединение наряду с β -адреностимулирующими свойствами обладает также способностью вызывать частичную β -адреноблокаду [1]. Известно, что β -адренергическое влияние в клетках животных реализуется через аденилатцикласную систему (АЦС) [3]. Молекулярные механизмы действия нонахлазина на адреноструктуру миокарда не выяснены.

В настоящей работе исследовали влияние нонахлазина на АЦС сердца кролика, регуляцию активности аденилатциклазы (АЦ) изопротеренолом, а также на связывание антагониста β -адренорецепторов [3 H]-дигидроалпренолола (ДГА).

Методика исследования. Мембраны сердца кролика выделяли по методу [2]. Мембранные препараты хранили при температуре жидкого азота. Активность АЦ определяли по методу [6]. Инкубацию проводили при 30 °C в среде, содержащей 50 мМ трис-HCl (pH 7,5), 5 мМ хлорид магния, 0,5 мМ цАМФ, 0,5 мМ изобутилметилксантин, 0,1 мМ ГТФ, 20 мМ креатинфосфат, 0,2 Е креатинфосфокиназы, 0,1 мМ АТФ, 0,5 мкКи (α - 32 P)-АТФ. Количество белка в пробе 10—30 мкг. Измерение связывания ДГА с β -адренорецепторами мембран сердца кролика проводили по методу [9]. Концентрацию белка определяли по методу [11]. В работе использовали следующие реактивы: трис, имидазол, цАМФ, АТФ, ГТФ, изопротеренол, ЭДТА, креатинфосфат, хлорид магния, изобутилметилксантин, бычий сывороточный альбумин («Sigma», США), креатинфосфокиназу («Boeringer», ФРГ), (α - 32 P)-АТФ, [3 H]-ДГА («Amersham», Англия).