

УДК 612.822.1+612.45.015.3
©Коллектив авторов

**ВЛИЯНИЕ АРЕКОЛИНА И АТРОПИНА НА АКТИВНОСТЬ
КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н
И ФЕНИЛМЕТИЛСУЛЬФОНИЛФТОРИД-ИНГИБИРУЕМОЙ
КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ В НЕРВНОЙ ТКАНИ КРЫС**

В.Б. Соловьев, М.Т. Гензин*

Пензенский государственный педагогический университет, 440026 Пенза,
ул. Лермонтова, 37; тел.: 8(8412)478570, 8(927)3602117;
эл. почта: solowew@rambler.ru

Однократное введение м-холиномиметика ареколина или м-холинолитика атропина крысам вызывало длительное, сохраняющееся по крайней мере в течение 72 ч, снижение активности карбоксипептидазы Н (КПН) и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-КП) в мозге и надпочечниках. Предполагается, что снижение активности исследуемых ферментов может быть одним из механизмов снижения уровня нейропептидов при угнетении и активации холинергической системы.

Ключевые слова: карбоксипептидаза Н, фенилметилсульфонилфторид-ингибируемая карбоксипептидаза, атропин, ареколин, нейропептиды, мозг.

ВВЕДЕНИЕ. В последнее время широко обсуждается участие пептидергической системы в механизмах действия холинотропных препаратов [1-3]. Результаты исследований последних лет свидетельствуют, что при их введении в мозг и сыворотке крови существенно снижается уровень целого ряда нейропептидов [1, 2, 4], многие из которых играют важную роль в этиологии и патогенезе алкоголизма, наркомании, болезни Паркинсона, болезни Альцгеймера – заболеваний, в развитии которых участвует холинергическая система [3, 5-9]. Возможно, что через пептидергическую систему опосредуется значительная доля физиологических эффектов, вызванных изменениями в функционировании холинергической системы [3, 10, 11]. Молекулярные механизмы действия холинотропных препаратов на уровень биологически активных пептидов не изучены. Активная форма регуляторных пептидов образуется в результате протеолитического процессинга пропептидов [12]. В конечных стадиях этого процесса, в результате которого образуются биологически-активные пептиды, участвуют основные карбоксипептидазы – экзопептидазы, отщепляющие “лишние” остатки аргинина и лизина с С-конца пропептидов [12-14], в частности, КПН и ФМСФ-КП. Известно, что КПН участвует в биосинтезе многих

* - адресат для переписки

нейропептидов, таких как инсулин [15], глюкагон [14], энкефалины, АКТГ, вазопрессин, окситоцин, вещество P, атриальный натрийуретический фактор [12]. Поскольку многие из этих пептидов принимают участие в ответе организма на введение холинотропных препаратов [1-3], то возможно, что КПН вовлекается в развитие этих реакций. Предполагают, что функции недавно обнаруженной ФМСФ-КП сходны с таковыми КПН [13]. Однако роль этого фермента, практически, не изучена.

МЕТОДИКА. Опыты выполнены на самцах белых беспородных крыс массой 200-300 г. Ареколин и атропин вводили внутривентриально в физрастворе в дозе 2,5 мг/кг. Контрольной группе животных вводили равный объём физраствора. Крыс декапитировали через 0,5, 4, 24 и 72 ч после инъекции, извлекали надпочечники, головной мозг и разделяли его на соответствующие отделы. Навески ткани гомогенизировали в 50 мМ натрий ацетатном буфере, содержащем 50 мМ NaCl, pH 5,6, в соотношении 1 : 50 (вес : объём). В полученном гомогенате определяли активность КПН и ФМСФ-КП флуорометрическим методом Fricker и Snyder [16].

Активность КПН оценивали по гидролизу дансил-Phe-Ala-Arg при pH 5,6, чувствительному к торможению высокоспецифичным ингибитором этого фермента - гуанидиноэтилмеркаптоянтарной кислотой (ГЭМЯК) [16], ФМСФ-КП по гидролизу дансил-Phe-Leu-Arg при pH 5,6, чувствительному к торможению ФМСФ [13]. Опытные пробы содержали 50 мкл гомогената и 150 мкл 50 мМ натрий ацетатного буфера, содержащего 50 мМ NaCl. В контрольные пробы вносили ГЭМЯК (в случае КПН) и ФМСФ (в случае ФМСФ-КП) в конечной концентрации 1 мкМ и 1 мМ соответственно. Пробы преинкубировали 8 мин при 37°C, затем вносили 50 мкл предварительно нагретого до 37°C раствора субстрата (концентрация в пробе 42 мкМ), приготовленного на том же буфере и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Реакцию останавливали прибавлением 50 мкл 1 М раствора HCl. Для экстракции продукта реакции (дансил-Phe-Ala в случае КПН и дансил-Phe-Leu в случае ФМСФ-КП) к пробам приливали по 1,5 мл хлороформа, интенсивно встряхивали в течение 60 с. Хлороформную и водную фазы разделяли центрифугированием в течение 10 минут при 5000 g.

Флуоресценцию хлороформной фазы измеряли на флуориметре ФМЦ-2 при $\lambda_{ex}=360$ нм и $\lambda_{em}=530$ нм в кювете толщиной 1 см. В качестве стандарта использовали 2 мкМ раствор дансил-фен-ала в хлороформе.

Активность фермента определяли как разность прироста флуоресценции между пробами, не содержащими и содержащими ингибитор, и выражали в нмоль продукта, образовавшегося за 1 минуту инкубации в пересчете на 1 мг белка. Количество белка в пробах определяли по методу Lowry [17].

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Результаты исследования активности КПН в отделах мозга и надпочечниках самцов крыс при введении ареколина в дозе 2,5 мг на кг массы представлены на рисунке 1. Через 4 и 24 ч после инъекции активность фермента в гипофизе по сравнению с контрольными самцами была ниже примерно на 30% и 40% соответственно. В гипоталамусе и четверохолмии активность КПН была снижена через 24 ч на 30% и 50% соответственно, а через 72 ч на 40% в обоих отделах. В продолговатом мозге, гиппокампе и стриатуме активность исследуемой карбоксипептидазы через 0,5 ч снижалась примерно на 20%, через 4 и 72 ч на 50%. В обонятельном мозге активность фермента снижалась через 4, 24 и 72 ч на 40% по сравнению с контролем. В надпочечниках активность исследуемого фермента была снижена на 55% через 0,5 ч, а через 4, 24 и 72 ч не отличалась от таковой у контрольных животных. Таким образом, введение ареколина в дозе 2,5 мг/кг вызывало существенное снижение активности КПН во всех отделах мозга и надпочечниках, причем наблюдались длительные, сохраняющиеся, по крайней мере, в течение 72 часов изменения активности фермента.

В гипофизе активность ФМСФ-КП после введения ареколина через 0,5, 4 и 24 ч была ниже по сравнению с контролем соответственно на 55, 50 и 65% (рис. 2). В обонятельном мозге через 0,5 ч после введения активность исследуемого фермента не изменялась, а через 4, 24 и 72 ч снижалась на 40, 20 и 45% соответственно. В четверохолмии активность ФМСФ-КП через 4 и 24 ч снижалась на 45-55% относительно контроля. В продолговатом мозге и стриатуме активность исследуемой карбоксипептидазы снижалась через 4 ч на 40-45%, а через 24 и 72 ч не отличалась от контрольной группы. В гипоталамусе активность данного фермента через 4 ч была на 55%, а через 72 ч на 50% ниже, чем у контрольных животных. В гиппокампе активность ФМСФ-КП не отличалась от контроля во все исследуемые промежутки времени. В надпочечниках наблюдалось снижение активности исследуемого фермента через 0,5 ч на 40%, а через 4 ч на 65%, тогда как через 24 и 72 ч активность фермента не отличалась от контроля.

Таким образом, при введении ареколина активность ФМСФ-КП изменялась сходным с КПН образом – наблюдалось значительное снижение активности во всех отделах мозга и надпочечниках, однако в изменении активности ФМСФ-КП наблюдались некоторые отличия: в гипофизе и надпочечниках снижение активности данного фермента было более выражено, тогда как для КПН было характерно более значительное снижение активности в стриатуме. Поскольку КПН и ФМСФ-КП отличаются субстратной специфичностью [12, 13, 16], то возможно, подобное различие в изменении активности связано с участием исследуемых карбоксипептидаз в процессинге разных биологически активных пептидов, уровень которых в гипофизе, стриатуме, гиппокампе и надпочечниках по-разному изменяется при введении ареколина [1, 2, 4].

Введении атропина в дозе 2,5 мг/кг вызывало снижение активности КПН в гипофизе через 0,5 и 4 ч после инъекции (рис. 3). В обонятельном мозге активность исследуемого фермента снижалась через 24 ч на 55% и оставалась сниженной спустя 72 ч после введения (на 13%). В четверохолмии обнаружено снижение активности КПН через 0,5, 24 и 72 ч, при этом максимальное снижение активности фермента (на 55%) наблюдается через 72 ч после инъекции. В продолговатом мозге активность КПН была снижена через 4 и 72 ч на 45-50%, тогда как через 0,5 и 24 ч не отличалась от контрольной группы. Введение атропина вызывало снижение активности исследуемого фермента в гипоталамусе во всех исследуемых промежутках времени на 35-40%. В гиппокампе и стриатуме активность КПН через 0,5 ч снижалась на 30-40%, через 4 ч на 40-45% и через 72 ч примерно на 30%. В надпочечниках достоверное изменение активности отмечено только через 72 ч после введения атропина: снижение на 60% по отношению к контролю.

Таким образом, введение атропина в дозе 2,5 мг/кг также как и ареколина в дозе 2,5 мг/кг вызывает длительное, сохраняющееся по крайней мере 72 ч снижение активности КПН во всех отделах мозга и надпочечниках крыс.

Результаты исследования влияния атропина (2,5 мг/кг) на активность ФМСФ-КП в отделах мозга и надпочечниках крыс представлены на рисунке 4. В гипофизе наблюдалось снижение активности ФМСФ-КП через 0,5 ч на 70%, а через 4 ч на 95% по сравнению с контрольной группой. В надпочечниках снижение активности исследуемого фермента наблюдалось спустя те же промежутки времени: через 0,5 ч на 35% и на 70% по прошествии 4 ч. В обонятельном мозге активность ФМСФ-КП снижалась по сравнению с контрольными животными на 35% через 4 и 24 ч. В четверохолмии и стриатуме активность исследуемой карбоксипептидазы через 4 ч была на 30-35% ниже, чем в контрольной группе. Атропин не оказывал влияния на активность ФМСФ-КП в продолговатом мозге на протяжении всего времени исследования. В гипоталамусе активность фермента снижалась только через 72 ч после инъекции. В гиппокампе активность ФМСФ-КП снижалась в два раза относительно контроля через 0,5 и 24 ч.

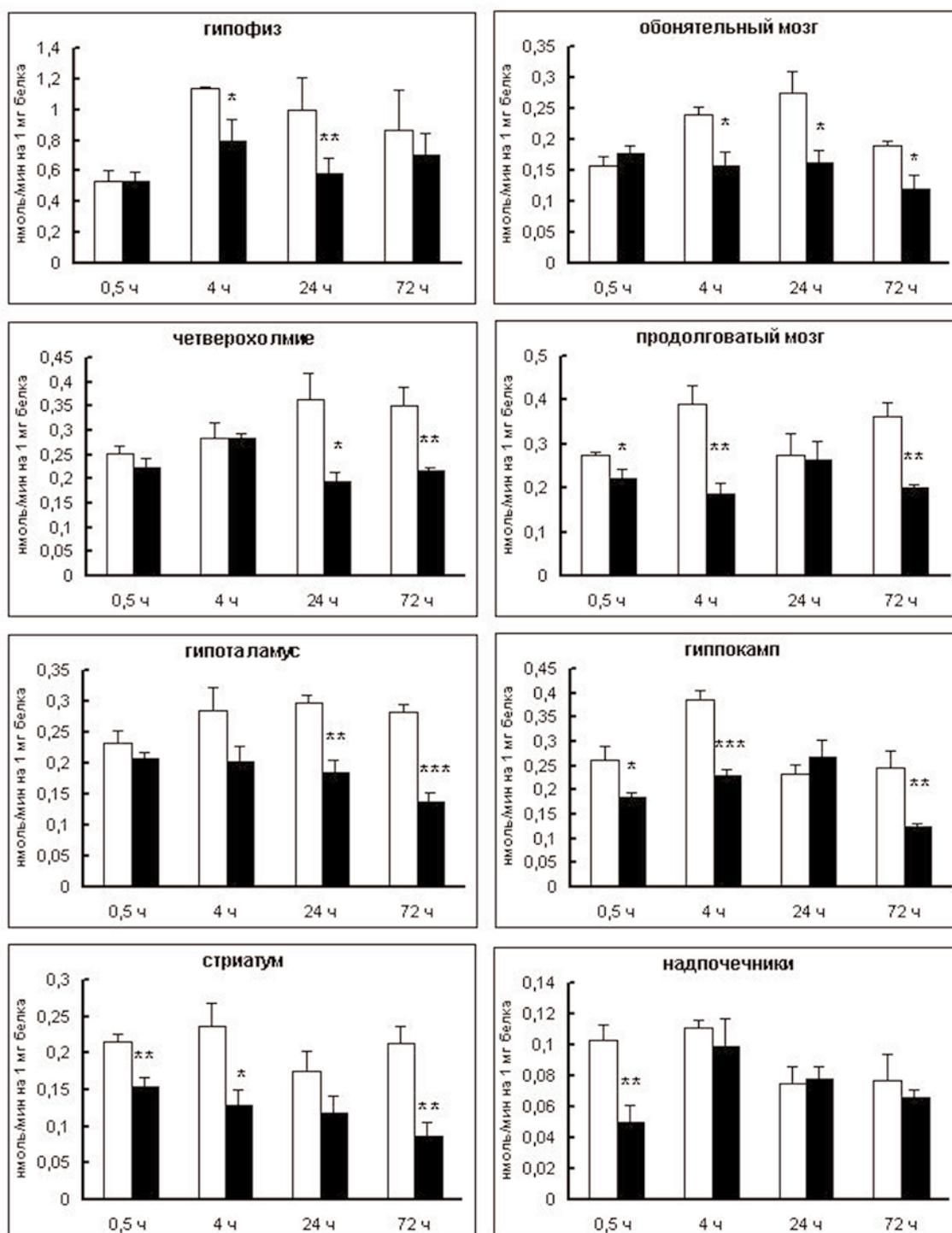


Рисунок 1.

Активность КПН при действии ареколина в нервной ткани крыс. Здесь и на рисунках 2-4 по оси ординат нмоль продукта, образовавшегося за 1 минуту инкубации на 1 мг белка (среднее арифметическое \pm ошибка средней, $n=4-6$). Здесь: \square - контроль, \blacksquare - ареколин 2,5 мг/кг. Здесь и на рисунках 2-4: * – $p<0,05$, ** – $p<0,01$, *** – $p<0,001$ относительно контроля.

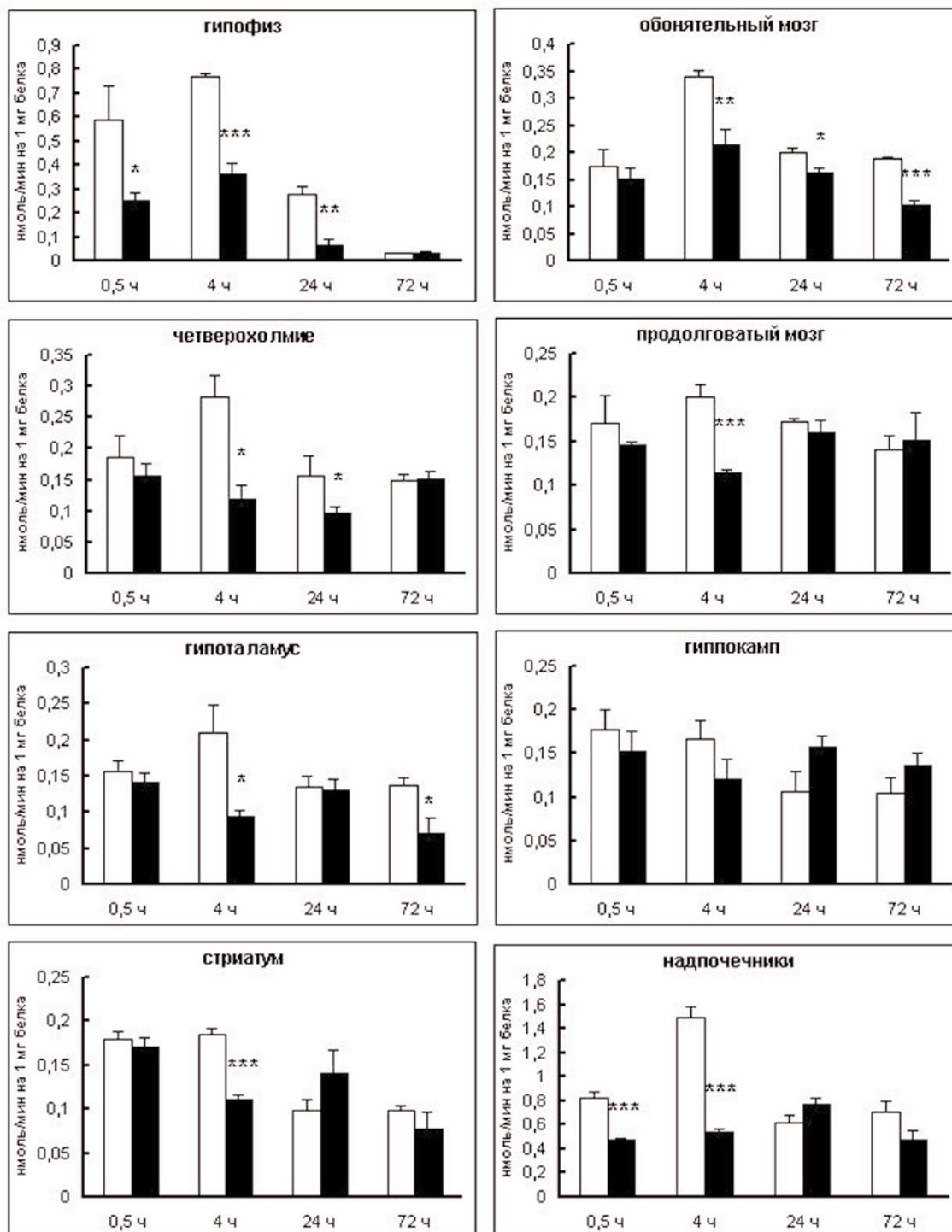


Рисунок 2.
Активность ФМСФ-КП при действии ареколина в нервной ткани крыс.
Здесь: □ - контроль, ■ - ареколин 2,5 мг/кг.

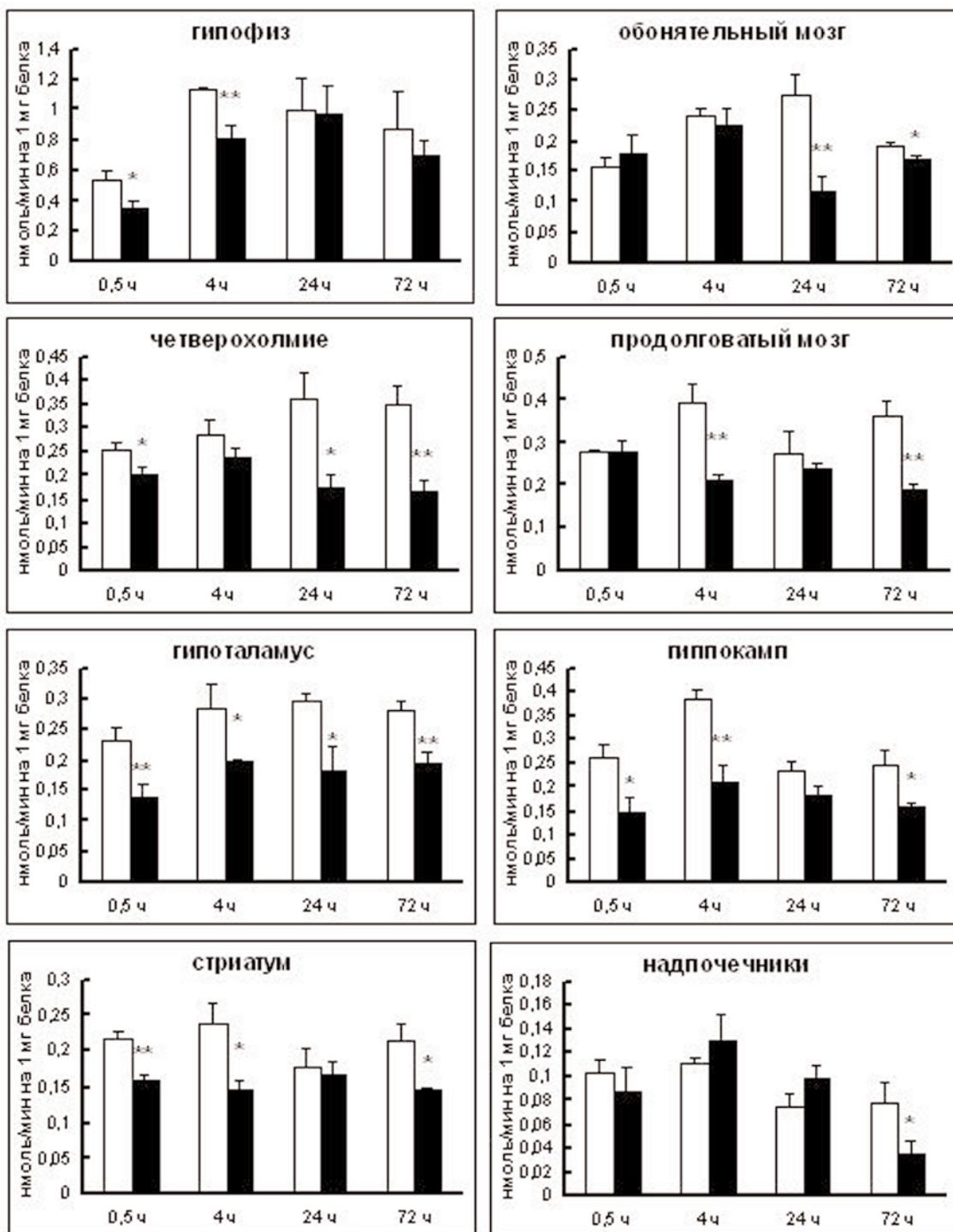


Рисунок 3.

Активность КПН при действии атропина в нервной ткани крыс.
Здесь: □ - контроль, ■ - атропин 2,5 мг/кг.

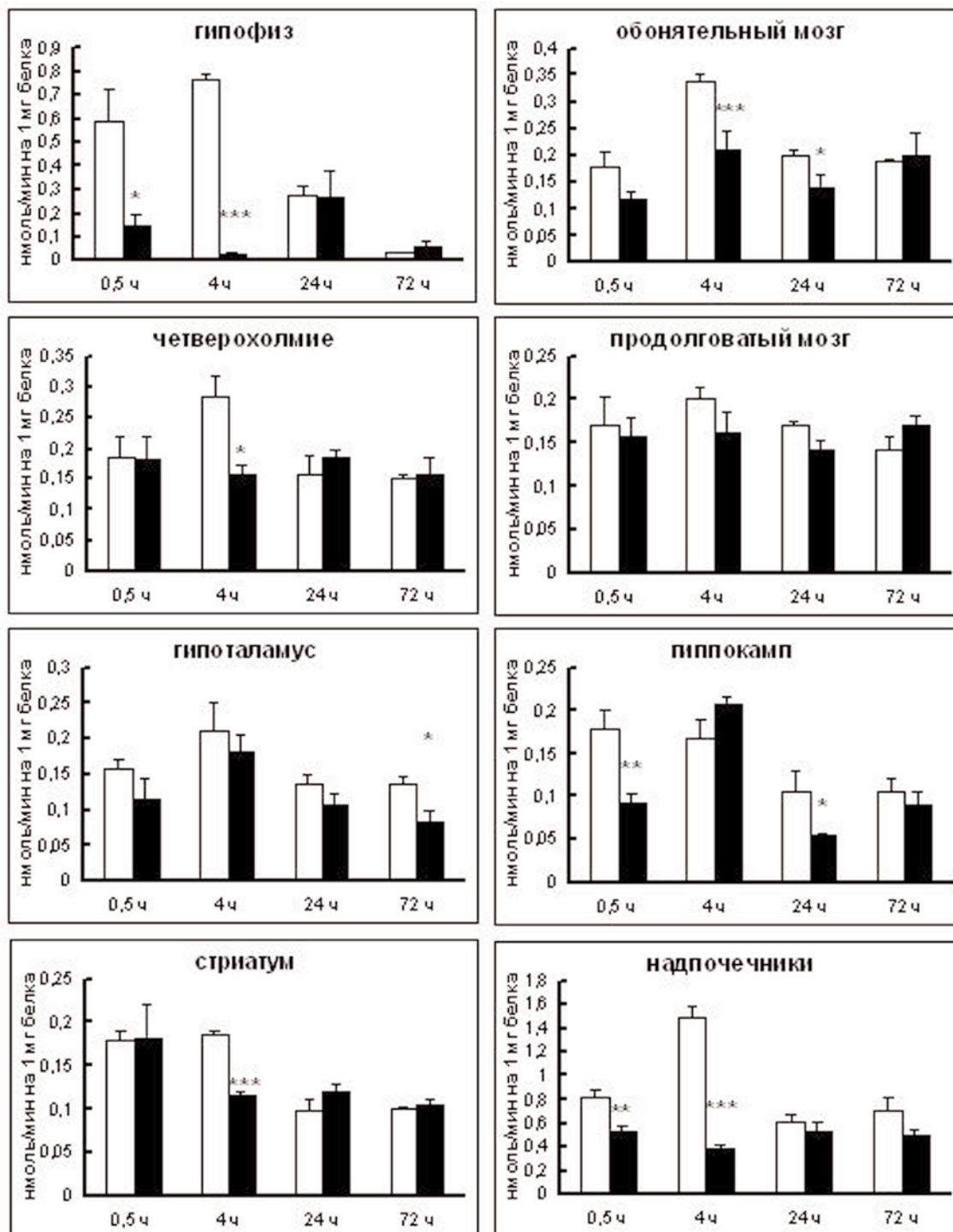


Рисунок 4.
Активность ФМСФ-КП при действии атропина в нервной ткани крыс.
Здесь: □ - контроль, ■ - атропин 2,5 мг/кг.

Таким образом, введение атропина в дозе 2,5 мг/кг вызывало снижение активности ФМСФ-КП во всех отделах мозга и надпочечниках крыс, кроме продолговатого мозга.

Несмотря на общую тенденцию снижения активности исследуемых ферментов в мозге и надпочечниках при введении атропина, имеют место и некоторые различия в степени снижения активности карбоксипептидазо-В-подобных ферментов. Так, наиболее существенное снижение активности в гипофизе при действии атропина наблюдалось для ФМСФ-КП – на 75% через 0,5 ч после инъекции и на 95% через 4 ч после введения, в то время как для КПН отмечено снижение активности лишь на 30%. Гипофиз является отделом, синтезирующим и/или секретирующим большой спектр регуляторных пептидов [6]. По-видимому, КПН принадлежит преобладающая роль в процессинге большинства пептидов – тропных гормонов, окситоцина, вазопрессина, атриального натрийуретического пептида, вещества Р и др. [12, 13, 16]. ФМСФ-КП, вероятно, участвует в процессинге опиоидных пептидов, синтезирующихся в гипофизе – энкефалинов и β-эндорфина, – уровень которых, по данным других авторов [1, 2, 4] значительно снижается при введении атропина. Снижение активности ФМСФ-КП в наших опытах при введении атропина может свидетельствовать о вовлечении данного фермента преимущественно в обмен энкефалинов.

Обращает на себя внимание тот факт, что в надпочечниках наиболее существенное снижение активности отмечено для ФМСФ-КП, в то время как для гипоталамуса и стриатума наиболее выраженные изменения активности наблюдались для КПН. Вероятно, снижение активности ферментов процессинга регуляторных пептидов может быть одним из механизмов снижения уровня энкефалинов и β-эндорфина при введении атропина [1, 2]. Учитывая преимущественную локализацию ФМСФ-КП в надпочечниках можно предположить, что именно здесь данный фермент участвует в генезе регуляторных пептидов, в то время как в стриатуме эта роль принадлежит КПН. В гипоталамусе синтез и секреция биологически активных пептидов этого отдела (аргинин-вазопрессин, окситоцин и др.) также подвержены влиянию холинергической системы [4]. Значительное снижение активности КПН, участвующей в образовании активных форм этих пептидов из предшественников [16], по всей видимости, обеспечивает снижение уровня аргинин-вазопрессина и окситоцина атропином [3].

Таким образом, ФМСФ-КП, как и КПН, вероятно, принадлежит важная роль в регуляции уровня активных форм нейропептидов при введении и холиноблокаторов и холиноактиваторов. При этом КПН и ФМСФ-КП, по-видимому, участвуют в процессинге не только разных биологических пептидов, но и вовлекаются в процессинг одних и тех же нейропептидов в разных отделах нервной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Громов Л.А., Жила В.А. (1986) Укр. биохим. журн., **58**(6), 61–63.
2. Громов Л.А., Кучеренко Н.Е., Цветкова О.А. (1982) в кн.: Фармакология, токсикология. (Громов Л.А., Кучеренко Н.Е., Цветкова О.А.), Здоров'я, Киев, сс. 29–31.
3. Крылов С.С. (1999) в: Клиническая токсикология лекарственных средств. Холинотропные препараты. (Крылов С.С., Ливанов Г.А., Петров А.Н. и др.), Лань, С-Пб, сс. 146-156.
4. Andersson K., Eneroth P., Fuxe K., Harfstrand A. (1998) *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, **337**(2), 131–139.
5. Гаврилова С.И. (1999) Материалы 2-й Российской конференции “Болезнь Альцгеймера и старение: от нейробиологии к терапии”, М., сс. 25–44.
6. Харкевич Д.А. (2000) Фармакология, ГЭОТАР Медицина, М.

7. *Fine A.* (1987) *Nature*, **319**, 537–538.
8. *Seizinger B.R., Bovermann K., Maysinger D.* (1983) *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **18**, 1–9.
9. *Wang H., Lee D.H.S., D'Andrea M.R., Peterson P.A., Shank R.P., Reitz A.B.* (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 5626–5632.
10. *Крылов С.С., Аматуни В.Н., Георгианова Е.К.* (1980) *Бюлл. эксп. биол. мед.*, **89**, 580–581.
11. *Gromov L.A., Krivorotov S.V., Skryta R.N.* (1983) *Neurosci.*, **3**(4), 855–860.
12. *Генгин М.Т., Вернигора А.Н.* (1994) *Укр. биохим. журн.*, **66**(2), 3–17.
13. *Вернигора А.Н., Никишин Н.Н., Генгин М.Т.* (1995) *Биохимия*, **60**, 1860–1866.
14. *Ahmad S., Ward P.E.* (1992) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **200**, 115–121.
15. *Song L.X., Fricker L.* (1995) *J. Neurochem.*, **65**, 444–453.
16. *Fricker L.D., Snyder S.H.* (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 10950–10955.
17. *Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.G., Randall R.J.* (1951) *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.

Поступила: 21. 06. 2007.

EFFECT OF SINGLE DOSE OF ARECHOLINE AND ATROPINE ADMINISTRATION ON THE CARBOXYPEPTIDASE H AND PHENYLMETHYLSULFONYL FLUORIDE-INHIBITED CARBOXYPEPTIDASE ACTIVITIES IN THE NERVES SYSTEM OF RATS

V.B. Solovey, M.T. Gengin

Penza State Pedagogical University, Lermontova ul., 37, Penza, 440007 Russia; tel. 8(8412)478570;
e-mail: solowew@rambler.ru

The effect of a single dose administration of arecholine and atropine on the activities of carboxypeptidase H and phenylmethylsulfonyl fluoride-inhibited carboxypeptidase involved into the final stage of formation of biologically active neuropeptides from precursors has been studied. Changes in the enzyme activities were evident during at least 72 h after administration of these drugs. These results suggest that one of possible mechanisms of reduction of neuropeptide levels by arecholine and atropine consists in suppression of activity of enzymes taking part in there metabolism – carboxypeptidase H and phenylmethylsulfonyl fluoride-inhibited carboxypeptidase.

Key words: carboxypeptidase H, phenylmethylsulfonyl fluoride-inhibited carboxypeptidase, atropine, arecholine, neuropeptides, brain.