

УДК 577.152.342

©Правосудова, Быкова

СРАВНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ОСНОВНЫХ КАРБОКСИПЕПТИДАЗ В ТКАНЯХ САМЦОВ КРЫС ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВВЕДЕНИИ ГАЛОПЕРИДОЛА

Н.А. Правосудова, И.О. Быкова*

Пензенский государственный университет,
Пенза, ул Красная, 40; тел.: 89273740054; эл. почта: pravosudova_natalja@rambler.ru

Изучено влияние однократного введения галоперидола на активность основных карбоксипептидаз (ферментов процессинга биологически активных пептидов) в тканях крыс. Острое воздействие галоперидола повышало активность карбоксипептидазы Н в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе и мозжечке и понижало в семенниках. Разнонаправленные изменения активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы после однократной инъекции галоперидола наблюдались во всех изученных тканях за исключением семенников. Предполагается, что изменение активности КП Н и ФМСФ-КП может влиять на уровень регуляторных пептидов в мозге и плазме крови, а через них – на функционирование других систем организма и вовлекаться в механизмы основного и побочного действия галоперидола на организм.

Ключевые слова: карбоксипептидаза Н, ФМСФ-ингибируемая карбоксипептидаза, галоперидол, нейропептиды.

ВВЕДЕНИЕ

Галоперидол является антипсихотическим препаратом, который широко применяется в клинической практике. Его действие обусловлено способностью блокировать дофаминовые D₂-рецепторы центральной нервной системы [1] и модулировать деятельность пептидергических систем [2]. Однако молекулярные механизмы влияния галоперидола на функционирование регуляторных пептидов остаются невыясненными [2].

Содержание регуляторных пептидов в организме зависит от соотношения скоростей их синтеза и распада [3]. Одним из основных ферментов, участвующих в синтезе нейропептидов, является карбоксипептидаза Н (КП Н; КФ 3.4.17.10). Вместе с тем предполагают, что функции недавно обнаруженной фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-КП) сходны с таковыми КП Н [4]. Однако биологическая роль этого фермента практически остается неясной.

Целью нашей работы было изучение влияния однократного введения галоперидола на активность карбоксипептидазы Н и ФМСФ-КП в тканях самцов крыс.

МЕТОДИКА

Объектом исследования служили гипоталамус, четверохолмие, мозжечок, стриатум, гиппокамп, большие полушария, гипофиз, надпочечники и семенники самцов лабораторных белых беспородных крыс массой 200-250 г.

При изучении влияния галоперидола на активность КП Н, и ФМСФ-КП *in vivo* препарат вводили внутривентриально в физрастворе в дозе 2 мг/кг веса. Контрольные животные получали равное количество физраствора. Крыс декапитировали под наркозом через 0,5 ч, 4 ч, 24 ч и 72 ч после введения препарата.

Для определения активности основных карбоксипептидаз ткани взвешивали, а затем

* - адресат для переписки

гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в 10 мМ натрий-ацетатном буфере (рН=5,6), содержащем 50 мМ NaCl в соотношении 1:100 (вес:объем).

Активность КП Н определяли модифицированным методом Fricker L.D. и Snyder S.H. [5]. Для определения активности фермента к 150 мкл (в случае опытной пробы) или 140 мкл (в случае контрольной пробы) 50 мМ натрий-ацетатного буфера, содержащего 50 мМ NaCl (рН 5,6), добавляли 50 мкл гомогената ткани. В контрольные пробы, кроме того, добавляли 10 мкл 25 мМ водного раствора гуанидиноэтилмеркаптоянтранной кислоты (ГЭМЯК). Пробы преинкубировали 8 мин при 37°C. Реакцию начинали прибавлением 50 мкл предварительно нагретого до 37°C 210 мМ дансил-Фен-Ала-Арг, приготовленного на воде (конечная концентрация в реакционной смеси составляла 42 мМ). Далее пробы инкубировали 60 мин при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 М раствора соляной кислоты. Для экстракции продукта реакции – дансил-Фен-Ала – к пробам приливали 1,5 мл хлороформа и встряхивали в течение 60 с. Для разделения фаз пробы центрифугировали 10 мин при 200 g. Измерение флуоресценции хлороформной фазы проводили на флуориметре ФМЦ-2 в кювете толщиной 1 см при $\lambda_{ex}=360$ нм и $\lambda_{em}=530$ нм. В качестве стандарта использовали 1 мМ раствор дансил-Фен-Ала в хлороформе. Активность КП Н определяли как разность в накоплении продукта реакции в пробах, не содержащих и содержащих ГЭМЯК, и выражали в нмоль дансил-Фен-Ала образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

Активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы определяли аналогичным способом. Контрольные пробы содержали 140 мкл 50 мМ натрий-ацетатного буфера, содержащего 50 мМ NaCl (рН 5,6), 10 мкл 25 мМ раствора фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ), приготовленного на этиловом спирте (конечная концентрация ФМСФ в реакционной смеси составляла 1 мМ) и 50 мкл гомогената. В опытные пробы вносили 150 мкл буфера и 50 мкл гомогената. Дальнейшее определение активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы проводили так же, как и для КП Н, с той лишь разницей, что вместо дансил-Фен-Ала-Арг в качестве субстрата использовали 50 мкл 210 мМ дансил-Фен-Лей-Арг. Активность фермента определяли как разность в накоплении продукта дансил-Фен-Лей в пробах, не содержащих и содержащих ФМСФ. Активность выражали

в нмоль дансил-Фен-Лей образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

Количество белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [6].

Экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение галоперидола не влияло на активность КП Н в четверохолмии, стриатуме, гиппокампе и больших полушариях. В семенниках достоверное снижение активности в 2 раза по отношению к контролю наблюдалось через 24 ч после воздействия (таблица). В гипоталамусе и мозжечке активность фермента через 0,5 ч была выше, чем у контрольной группы на 57% и 46% соответственно. Наблюдалось повышение активности КП Н в гипофизе через 0,5 ч в 2 раза и через 4 ч на 74% в сравнении с контролем. В надпочечниках значение исследуемого параметра было в 1,6 раза выше, чем у контрольных животных, через 4 ч после инъекции галоперидола.

Галоперидол в дозе 2 мг/кг вызывал достоверные изменения активности КП Н в отделах гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы. При этом повышение ферментативной активности в гипоталамусе наблюдалось уже через 0,5 ч, в гипофизе – через 0,5 ч и 4 ч, в надпочечниках – через 4 ч и 72 ч после инъекции. При введении галоперидола отмечалось повышение уровня проопиомеланокортина в промежуточной доле гипофиза [7] и усиление секреции гормонов гипофиза [8]. Сопоставление этих данных с результатами нашей работы позволяет предположить, что КП Н участвует в реализации эффекта галоперидола.

В мозжечке активность фермента через 0,5 ч была выше, чем у контрольной группы. Известно, что при введении галоперидола крысы становятся вялыми, особенно в течение 0,5 ч после инъекции [9]. Этот эффект может быть вызван повышением уровня обладающего седативным действием динофина, в образовании которого участвует КП Н.

Достоверное снижение активности КП Н по отношению к контролю наблюдалось в семенниках через 24 ч и 72 ч после воздействия. Инъекция галоперидола вызывает повышение секреции гонадотропина [10], влияющего на уровень половых стероидов, которые в свою очередь снижают активность карбоксипептидазы Н [11].

Таблица. Активность КП Н и ФМСФ-КП в тканях крыс при однократном введении галоперидола.

Отделы мозга, органы	Время после воздействия (часы)	Контроль	КП Н	ФМСФ-КП
Гипофиз	0,5 ч	0,42±0,10	0,83±0,09*	0,76±0,07
	4 ч	0,66±0,17	1,15±0,11*	0,36±0,04*
	24 ч	0,89±0,08	0,93±0,08	0,68±0,09
	72 ч	0,92±0,13	0,73±0,09**	0,60±0,05
Гипоталамус	0,5 ч	0,21±0,02	0,33±0,04*	0,21±0,03
	4 ч	0,33±0,03	0,31±0,02	0,16±0,01**
	24 ч	0,30±0,02	0,29±0,01	0,20±0,02
	72 ч	0,33±0,02	0,32±0,02	0,24±0,01
Четверохолмие	0,5 ч	0,26±0,04	0,29±0,03	0,27±0,02*
	4 ч	0,28±0,02	0,31±0,01	0,16±0,01*
	24 ч	0,28±0,02	0,25±0,01	0,18±0,01
	72 ч	0,32±0,01	0,28±0,02	0,20±0,01***
Мозжечок	0,5 ч	0,13±0,02	0,19±0,02*	0,27±0,02
	4 ч	0,16±0,01	0,17±0,01	0,19±0,01*
	24 ч	0,18±0,01	0,18±0,01	0,25±0,02
	72 ч	0,18±0,01	0,17±0,01	0,25±0,01
Стриатум	0,5 ч	0,15±0,02	0,19±0,2	0,29±0,03**
	4 ч	0,18±0,01	0,19±0,02	0,14±0,01**
	24 ч	0,19±0,01	0,17±0,01	0,18±0,02*
	72 ч	0,20±0,01	0,22±0,02	0,23±0,01
Гиппокамп	0,5 ч	0,22±0,02	0,28±0,02	0,22±0,01**
	4 ч	0,26±0,02	0,26±0,01	0,12±0,01***
	24 ч	0,25±0,01	0,22±0,02	0,16±0,01
	72 ч	0,27±0,01	0,28±0,01	0,21±0,02
Большие полушария	0,5 ч	0,24±0,02	0,26±0,02	0,30±0,03*
	4 ч	0,21±0,2	0,25±0,02	0,17±0,03
	24 ч	0,22±0,02	0,21±0,01	0,19±0,01**
	72 ч	0,25±0,02	0,20±0,02	0,27±0,01
Надпочечники	0,5 ч	0,09±0,01	0,10±0,01	1,47±0,14**
	4 ч	0,08±0,01	0,13±0,02*	0,87±0,13
	24 ч	0,10±0,01	0,09±0,01	0,88±0,08*
	72 ч	0,13±0,02	0,09±0,01*	1,17±0,03
Семенники	0,5 ч	0,04±0,01	0,06±0,01	0,14±0,02
	4 ч	0,04±0,01	0,07±0,01	0,11±0,03
	24 ч	0,06±0,01	0,03±0,004*	0,09±0,01
	72 ч	0,07±0,01	0,04±0,003*	0,14±0,01

Примечание. Результаты представлены в виде средней величины ± ошибка средней. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по отношению к контролю.

Активность ФМСФ-ингибируемой КП значительно повышалась в стриатуме через 0,5 ч после воздействия (таблица). Согласно данным ряда исследователей [12], однократная инъекция галоперидола приводит к увеличению уровня мет-энкефалина и нейротензина в стриатуме. Кроме того, уровень нейротензина, сниженный у больных шизофренией, восстанавливается после лечения галоперидолом [13]. Поскольку изменение активности КП Н в этом отделе мозга не обнаружены, то можно предположить, что в процессинг регуляторных пептидов, синтезируемых в стриатуме при введении галоперидола, вовлечена ФМСФ-ингибируемая КП.

Через 4 ч и 24 ч после внутрибрюшинного введения галоперидола наблюдалось небольшое, но достоверное снижение активности фермента по отношению к контрольной группе животных. Повышение активности ФМСФ-ингибируемой КП через 0,5 ч и понижение через 4 ч и 72 ч наблюдалось в четверохолмий. Однонаправленные изменения (повышение активности фермента через 0,5 ч и понижение через 4 ч или 24 ч) наблюдались в эмоциогенных структурах: гиппокампе и больших полушариях.

Известно, что при введении галоперидола в гиппокампе и больших полушариях повышается уровень холецистокинина и вещества Р [14]. Не исключено, что ФМСФ-ингибируемая КП участвует в обмене этих пептидов. В отличие от КП Н активность ФМСФ-ингибируемой КП понижалась в гипофизе, гипоталамусе и мозжечке через 4 ч после воздействия. В надпочечниках активность фермента через 0,5 ч после введения галоперидола повышалась, а через 24 ч понижалась. Поскольку в надпочечниках синтезируется большое количество мет-энкефалина, предшественники которого являются более предпочтительными субстратами для ФМСФ-КП [4], можно предположить, что этот фермент вовлечён в обмен энкефалинов в надпочечниках.

Известно, что карбоксипептидаза Н участвует в процессинге предшественников АКТИГ, энкефалинов, холецистокинина, вещества Р, нейротензина и многих других биологически активных пептидов [5, 7]. Анализ аминокислотной последовательности данных пептидов и субстратной специфичности ФМСФ-ингибируемой КП позволяет предположить, что данная карбоксипептидаза наряду с КП Н может вовлекаться в процессинг предшественников этих регуляторных пептидов [4]. Таким образом, одним из механизмов изменения уровня биологически активных

пептидов психолептиками может быть изменение активности ферментов их обмена – КП Н и ФМСФ-КП.

ВЫВОДЫ

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что активность основных карбоксипептидаз регулируется галоперидолом. Изменение активности КП Н и ФМСФ-КП может влиять на уровень регуляторных пептидов в мозге и плазме крови, а через них – на функционирование других систем организма и вовлекаться в механизмы основного и побочного действия галоперидола на организм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang Y., Goldman-Rakic P.S. (2004) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **101**, 5093-5098.
2. Крылов С.С., Ливанов Г.А., Петров А.Н., Семенов Е.В., Спринц А.М., Бучко В.М. (1999) в: Клиническая токсикология лекарственных средств. Холинотропные препараты, Лань, Санкт-Петербург, 60-73.
3. Вернигора А.Н., Генгин М.Т. (1996) Биохимия, **61**, 771-785.
4. Генгин М.Т. (2002) Особенности структурно-функциональной организации и физико-химические свойства нелизосомальных пептидгидролаз мозга животных. Дисс. докт. наук, Российский университет дружбы народов, Москва.
5. Fricker L.D., Snyder S.H. (1983) J. Biol. Chem., **258**, 10950-10955.
6. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.G., Randall R.J. (1951) J. Biol. Chem., **193**, 265-275.
7. Chen C.L., Dionne F.T., Roberts J.L. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **80**(8), 2211-2215.
8. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л. (1987) Рецепторы физиологически активных веществ, Медицина, Москва.
9. Коста Е., Фрамма В., Хонг Дж.С., Морони Ф., Янг Х.-Ю.Т. (1981) в кн.: Эндорфины. Мир, Москва, сс. 217-227.
10. Rocca P., Bellone G., Benna P., Bergamaso B., Ravizza L., Ferrero P. (1993) J. Immunopharmacol., **25**, 163-178.
11. Салдаев Д.А. (2001) Активность основных карбоксипептидаз в тканях мышей при введении тестостерона и прогестерона. Автореф. дисс. канд. наук, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург.
12. Pillot C., Ortiz J., Héron A., Ridray S., Schwartz J.C., Arrang J.M. (2002) J. Neurosci., **22**, 7272-7280.
13. Adams M.R., Dobie D.J., Merchant K.M., Unis A., Dorsa D.M. (1997) Peptides, **18**, 527-535.
14. Zachrisson O., Nomikos G.G., Marcus M.M., Svensson T.H., Lindefors N. (2000) Eur. Neuropsychopharmacol., **10**, 355-363.

Поступила: 23. 04. 2013.

**COMPARISON OF BASIC CARBOXYPEPTIDASES ACTIVITY IN MALE RATS TISSUES
AT A SINGLE INJECTION OF HALOPERIDOL**

N.A. Pravosudova, I.O. Bykova

Penza State University, ul. Krasnaya, 40, Penza, Russia;
tel.: 89273740054; e-mail: pravosudova_natalja@rambler.ru

The influence of a single injection of haloperidol on basic carboxypeptidases (biologically active peptide processing enzymes) activity in rat tissues was studied. Acute exposure to haloperidol increased the activity of carboxypeptidases H (CP H) in hypothalamic-pituitary-adrenal system and cerebellum and reduced such activity in testes. Multidirectional changes of PMSF-inhibited carboxypeptidases activity (PMSF-CP) were observed after a single haloperidol injection in all studied tissues except testes. It is suggested that changes of CP H and PMSF-CP activity might affect levels of regulatory peptides in the brain and blood and thus may be involved in general and side effects of haloperidol on the organism.

Key words: carboxypeptidase H, PMSF-inhibited carboxypeptidase, haloperidol, neuropeptides.