

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

УДК 612.822.1.018:[547.95:547.943]015.1

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЭНКЕФАЛИНОБРАЗУЮЩЕЙ
КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н В ГИПОФИЗЕ, НАДПОЧЕЧНИКАХ
И СТРИАТУМЕ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИНСУЛИНА

ГРИГОРЬЯНЦ О. О., РОСТОВЦЕВ А. П., МАТВИЕНКО И. Н., ГОМАЗКОВ О. А.

Институт биологической и медицинской химии АМН СССР, Москва

Регуляция биосинтеза энкефалинов может осуществляться при воздействии различных фармакологических агентов, таких как резерпин, никотин, форсколин, дексаметазон, инсулин [1—5]. Изменение уровня опиоидных пептидов и проэнкефалиновой мРНК при этих воздействиях свидетельствует о регуляции их биосинтеза ферментами процессинга. Карбоксипептидаза Н [К.Ф. 3.4.17.16] катализирует конечную стадию образования энкефалинов, входящих в одну из главных стресслимитирующих систем организма. Под воздействием инсулина в надпочечниках крыс изменялся уровень катехоламинов, энкефалинов и проэнкефалиновой мРНК [4], а также активность карбоксипептидазы Н и уровень мРНК прокарбоксипептидазы Н [6].

Целью настоящей работы было изучение региональной активности карбоксипептидазы Н в гипофизе, надпочечниках и стриатуме в динамике воздействия инсулина.

В работе использовали крыс-самцов линии *Wistar* массой 200 г; Dansyl-Phe-Leu-Arg («Calbiochem», США), индикаторные полоски на глюкозу «Dextrostix» («Ames», Франция), инсулин (завод мед. препаратов, г. Ленинград), остальные реактивы отечественного производства категории х.ч. Все растворы готовили на деионизованной воде.

Ткани, выделенные сразу после декапитации крыс, гомогенизировали в 10 мМ трис-НСI буфере рН 7,7, содержащем 0,25 М сахарозу. Готовили 2%-ный гомогенат для стриатума, 0,1%-ный—для гипофиза и 0,15%-ный—для мозгового слоя надпочечников. Разрушение тканей проводили на гомогенизаторе «VirTis» при 40 000g дважды по 30 с с минутными интервалами. Гомогенаты осветляли центрифугированием на микроцентрифуге «Eppendorf-5414» в течение 5 мин при 10 800g.

Активность карбоксипептидазы Н определяли по методу Fricker, Snyder [7] и вычисляли по разнице активностей с добавлением и без добавления Co^{2+} . Концентрацию белка определяли по методу Lowry и соавт. [8].

Инсулин вводили крысам подкожно в дозе 50 ед/кг массы. Контрольным животным вводили физиологический раствор. Забой крыс проводили через 2 ч, 1, 4 и 7 суток после инъекции. В каждой группе находилось по 8 животных.

Экспериментальные результаты обрабатывали с использованием t-критерия Стьюдента и непараметрическими методами.

С целью подбора эффективных доз инсулина определяли изменения уровня сахара крови у крыс, получавших от 1 до 50 ед препарата на кг массы тела. При введении инсулина в дозах от 1 до 10 ед/кг не наблюдали существенного снижения уровня сахара крови, а при введении 10, 25 и 50 ед/кг происходило резкое снижение уровня сахара с 7—8 до 1—3 мм в течение 1—2 ч с последующим постепенным восстановлением. Через 1 сутки уровень сахара соответствовал исходному. Изменения уровня сахара крови крыс в первые часы после инъекции инсулина представлены на рисунке. Ни одна из указанных доз не вызывала летального исхода. Для получения наиболее выраженного эффекта была выбрана рабочая доза инсулина 50 ед/кг.

Таблица

Изменение активности карбоксипептидазы Н после введения инсулина крысам

кань	Время после введения	Концентрация белка, мг/мл	Удельная активность, нмоль/мин·мг
Гипофиз	К	0,06±0,01	41,09±5,27
	2 ч	0,12±0,06	*31,5±4,45
	1 сутки	0,06±0,01	*51,31±4,87
	4 сутки	0,05±0,02	*70,22±8,34
	7 сутки	0,08±0,01	*2,91±4,18
Стриатум	К	1,01±0,10	1,63±0,07
	2 ч	1,16±0,36	1,89±0,32
	1 сутки	1,01±0,09	1,74±0,12
	4 сутки	1,01±0,12	1,63±0,06
	7 сутки	1,02±0,11	*1,43±0,04
Мозговой слой надпочечной коры	К	0,11±0,04	4,23±1,03
	2 ч	0,07±0,05	4,48±1,06
	1 сутки	0,1±0,03	3,25±0,33
	4 сутки	0,5±0,03	4,72±0,63
	7 сутки	0,10±0,03	*11,94±1,98

Примечание. *—достоверные различия с показанными в контроле ($p < 0.05$).

Изменения активности карбоксипептидазы Н в тканях крыс в динамике гипогликемического шока, вызванного инсулином, представлены в таблице. В гипофизе наблюдались фазные изменения величины У. А. карбоксипептидазы Н. Через 2 ч после инъекции инсулина

активность фермента достоверно снижалась на 23%, через 1 сутки—возросла на 24% по сравнению с контролем, к 4 суткам достигла максимального значения (171%). К 7 суткам активность фермента в гипофизе снизилась, однако превышала контрольный уровень на 29%. В стриатуме, в отличие от гипофиза, изменение величины У.А. карбоксипептидазы Н было выражено минимально. Достоверное снижение отмечалось только на 7 сутки (на 9%). В мозговом слое над-

Уровень
глюкозы, мм

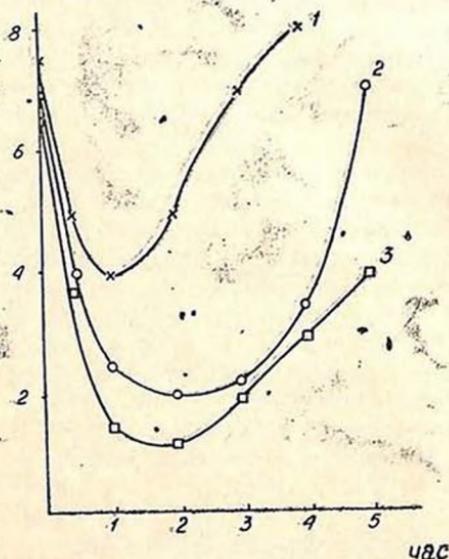


Рис. Изменение уровня сахара в крови крыс после инъекции инсулина. Дозы инсулина: 1—10 ед/кг; 2—25 ед/кг; 3—50 ед/кг.

почечников У.А. карбоксипептидазы Н на протяжении 4 суток не претерпевала значимых изменений, однако на 7 сутки после введения инсулина достоверно возросла на 182% по сравнению с контролем.

Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о различной динамике активности карбоксипептидазы Н в мозгу, гипофизе и надпочечниках после введения инсулина. Эти результаты совпадают с общей концепцией тканеспецифичности процессинга нейропептидов при различных физиологических и патологических состояниях в соответствии с выполняемой ими функцией [9]. Ранее мы наблюдали региональные изменения активности карбоксипептидазы Н при гравитационном стрессе, у крыс с агрессивным поведением, при алкогольной нагрузке [10—12]. Данные опытов с инсулином соответствуют общей закономерности таких сдвигов энкефалинообразующей активности в различных регионах.

Полученные здесь результаты можно также сопоставить с данными Kanamatsu и соавт. [4] об изменениях уровня энкефалинов,

энкефалинсодержащих пептидов и проэнкефалиновой мРНК в течение 7 суток после однократного воздействия на крыс инсулина. Динамика этих взаимосвязанных компонентов биогенеза энкефалинов может быть дополнена нашими результатами по изменению активности карбоксипептидазы Н. Полученные в 1990 г. данные Fricker и соавт. [6] об изменениях уровня мРНК прокарбоксипептидазы Н в надпочечниках под действием инсулина совпадают с полученными нами изменениями активности карбоксипептидазы Н.

Приведенные данные свидетельствуют о региональной специфичности изменений активности карбоксипептидазы Н, которые соответствуют участию энкефалиновой системы в изменениях функционального состояния организма.

ALTERATION OF ENKEPHALIN-FORMING CARBOXYPEPTIDASE H ACTIVITY IN PITUITARY, ADRENAL AND STRIATUM AT THE INSULIN STRESS

GRIGORIANTS O. O., ROSTOVITSEV A. P., MATVIENKO N. N.,
GOMAZKOV O. A.

Institute of Biological and Medical Chemistry, Moscow.

Regional carboxypeptidase H activity in rat pituitary, adrenal and striatum was studied at the dynamic of insulin stress during 7 days. Phase alterations were mentioned in pituitary: the 2 hours, followed by its increase that reach the maximal level at 4th day (+171%). Changes in striatum enzyme activity were minimally expressed. The increase of activity by 182% in adrenal medulla was obtained in 7th day. These data testify to regional peculiarities in the enzyme activity that correspond to participation of enkephalin system in the regulation of organism functional state.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Hook V. Y. H., Eiden L. E., Pruss R. M. J. Biol. Chem., v. 260, № 10, p. 5991—5997, 1935.
2. Mocchetti I., Guidotti A., Schwarts J. P., Costa E. J. Neurosci., v. 5, № 12, p. 3379—3385, 1985.
3. Yoshikawa K., Sabol S. I. Biochem. and Biophys. Res. Commun., v. 130, № 1, p. 1—10, 1986.
4. Kanamatsu T., Unsworth C. D., Ciliberto E. J., Jr., Viveros O. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 83, № 23, p. 9245—9249, 1986.
5. Hook V. Y. H., Eiden L. E. Biochem. Biophys. Res. Commun., v. 128, № 2, p. 563—570, 1985.
6. Fricker L. D., Rigual R. J., Diliberto E. J., Jr., Viveros O. H. J. Neurochem., v. 55, p. 451—467, 1990.
7. Fricker L. D., Snyder S. H. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, v. 79, № 12, p. 3886—3890, 1982.

8. *Loewy O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.* J. Biol. Chem. v. 193. № 1, p 265—275, 1951.
9. *Гомазков О. А., Григорьянц О. О.* Успехи совр. биол., т. 108, вып. 1, с. 109—124, 1989.
10. *Гомазков О. А., Ростовцев А. П., Комиссарова Н. В., Панфилов А. Д., Елистратова И. А., Фомин В. В.* Патол. физиол. эксперим. терап. № 5. с. 52—54, 1988.
11. *Гомазков О. А., Ростовцев А. П., Панфилов А. Д.* Нейрохимия, № 2, с. 215—226, 1989.
12. *Гомазков О. А., Панфилов А. Д., Ростовцев А. П., Комиссарова Н. В., Фомин В. В., Григорьянц О. О.* Вопр. мед. химии, № 4, с. 33—37, 1991.

Поступила 3. XII. 1991