

УДК 577.156:612.8.015

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГИОНАЛЬНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ
КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н В ЦНС КОШЕК

ВЕРНИГОРА А. Н.,* ГЕНГИН М. Т.,* САВЧЕНКО Р. П.**

*Пензенский госпединститут им. В. Г. Беллинского

**Пензенский институт усовершенствования врачей

Процессинг регуляторных пептидов включает последовательное действие на белки-предшественники различных по специфичности действия пептидгидролаз [1, 2]. На терминальной стадии генеза пептидов вовлекаются пептидгидролазы, катализирующие отщепление с С-конца основных аминокислот [3—5]. Подобный механизм образования характерен для МСГ, инсулина, энкефалинов [2] и других физиологически активных пептидов [2, 6]. Естественно предположить, что уровень тех или иных регуляторных пептидов в определенной степени будет зависеть от состояния ферментов, участвующих в их генезе, и, в особенности, тех пептидгидролаз, которые функционируют на заключительной стадии процессинга. В мозгу крыс обнаружена карбоксипептидаза, отщепляющая аргинин с С-конца проэнкефалинов [7, 8], что дало основание авторам назвать этот фермент «энкефалинконвертазой» [7]. Последние работы, однако, ставят под сомнение адекватность такого названия фермента, поскольку не всегда имеет место корреляция между уровнем активности «энкефалинконвертазы» и содержанием энкефалинов в тех или иных отделах мозга [9]. Высказываются предположения, что карбоксипептидаза Н (К.Ф. 3.4.17.10) («энкефалинконвертаза»), возможно, участвует в генезе и других регуляторных пептидов мозга [10]. Более определенное заключение о роли карбоксипептидазы Н в мозгу на сегодня не представляется возможным в силу недостаточной ее изученности.

Мы изучали распределение карбоксипептидазы Н в различных морфофункциональных структурах ЦНС кошек.

Исследования проводили на половозрелых самцах. Животных декапитировали, быстро извлекали мозг и помещали в предварительно охлажденный 0,25 М раствор сахарозы. Затем мозг тщательно очищали от оболочек и кровеносных сосудов, разделяли на соответствующие отделы и структуры и гомогенизировали в 20 мМ

Na-ацетатном буфере, pH 5,6, в соотношении 1:50 (вес/объем). Гомогенат центрифугировали в рефрижераторной центрифуге в течение 60 мин при 20000 g. Надосадочную жидкость сливали (растворимая фракция), а осадок ресуспендировали в исходном объеме того же буфера (мембраносвязанная фракция).

Активность фермента определяли в гомогенате, растворимой и мембраносвязанной фракциях. Предварительно фракции разбавляли таким образом, чтобы содержание белка в пробе было в пределах 0,3—0,4 мг. Зависимость ферментативной реакции от времени оставалась линейной при содержании белка в пробе в интервале 0,02—0,9 мг и концентрации субстрата 42 мкМ.

Перед определением активности фермента смешивали 350 мкл соответствующей фракции с 50 мкл 10 мМ CoSO₄, приготовленном на 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 5,6 или 50 мкл того же буфера, не содержащего кобальта (контрольные пробы) и преникубировали 8 мин при 37°. Затем в пробы добавляли 100 мкл раствора субстрата (дансил-Phe-Leu-Ary) в 50 мМ Na-ацетатном буфере, pH 5,6, конечная концентрация субстрата 42 мкМ.

Пробы инкубировали 1 мин при 37°. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1 н. HCl. Для экстрагирования продукта реакции (дансил-Phe-Leu) в пробы приливали по 2 мл хлороформа, тщательно встряхивали в течение 40 с и центрифугировали 5 мин при 1000 об/мин. Отбирали 1,5 мл хлороформной фазы и измеряли в ней флуоресценцию на ФМЦ—2 при $\lambda=530$ нм. Светофильтр возбуждения— $\lambda=360$ нм.

Активность карбоксипептидазы H определяют по разнице в значениях флуоресценции проб, содержащих кобальт и без кобальта.

Белок определяют по Lowry [11]. Экспериментальный материал обрабатывали статистически [12].

Как свидетельствуют данные, приведенные в таблице, активность карбоксипептидазы H обнаруживается во всех исследованных отделах и структурах ЦНС кошек, однако по величине У. А. эти отделы существенно различаются между собой. Так, минимальная активность характерна для гомогената белого вещества поясничного утолщения спинного мозга (0,081 нМ/мин/мг белка), а максимальная—для гипофиза (9,70 нМ/мин/мг белка).

Активность карбоксипептидазы II в передних и задних корешках обнаруживается на уровне следовых количеств, аналогично распределение по отделам и общей активности фермента. Подобное распределение активности карбоксипептидазы H имеет место и в мозгу крыс [9].

Активность фермента обнаруживается как в растворимой фракции, так и во фракции мембранных структур, однако соотношение растворимой и мембраносвязанной форм различно для отделов ЦНС кошек.

тазы Н в различных отделах и структурах ЦНС кошек (нм/мин 10 мг ткани (1), нМ/мин/мг белка (2), $M \pm m$, n = 4-6)

я ло ство	Головной мозг								Спинальный мозг				
	мозо- лосто- тел	гипофиз	гипо- таламус	стриа:ум	гиппо- камп	мозже- чок	средний мозг	продолго- ватый мозг	поясничное утолщение			передние корешки	задние корешки
									передние рога	задние рога	белое вещество		
79± 37	0,423± 0,053	13,68± 0,44	0,601± 0,044	0,548± 0,043	0,090± 0,071	0,291± 0,006	0,24± 0,025	0,196± 0,016	0,343± 0,020	0,399± 0,019	0,066± 0,011	≤0,019	≤0,029
94± 40	0,436± 0,055	9,70± 0,32	0,663± 0,050	0,571± 0,045	0,869± 0,078	0,339± 0,007	0,314± 0,035	0,225± 0,012	0,254± 0,015	0,296± 0,014	0,081± 0,014	≤0,019	≤0,031
60± 07	0,106± 0,010	6,26± 0,29	0,152± 0,025	0,109± 0,007	0,143± 0,021	0,093± 0,006	0,097± 0,016	0,070± 0,008					
45± 62	0,818± 0,077	10,98± 0,50	0,952± 0,157	0,645± 0,042	0,891± 0,130	0,486± 0,035	0,694± 0,073	0,541± 0,030					
41± 06	0,255± 0,016	5,98± 0,94	0,454± 0,004	0,433± 0,045	0,492± 0,081	0,171± 0,014	0,209± 0,043	0,158± 0,021					
52± 11	0,162± 0,023	7,38± 1,16	0,622± 0,005	0,528± 0,055	0,647± 0,106	0,244± 0,050	0,368± 0,063	0,197± 0,027					

В мозжечке, продолговатом мозгу, сером, белом веществе больших полушарий, мозолистом теле, среднем мозгу соотношение активности в мембраносвязанной фракции к активности в растворимой составляет 2:1. В гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе—3:1, в гипофизе—1:1. Следовательно, за исключением гипофиза, в отделах мозга кошек превалирует мембраносвязанная форма фермента. Величина же У. А. карбоксипептидазы растворимой фракции выше во всех без исключения отделах ЦНС по сравнению с мембраносвязанной фракцией, что объясняется относительно низким содержанием белка в растворимой фракции—примерно 20% от общего его содержания в гомогенатах. При этом также имеет место различие в соотношении У. А. растворимой и мембраносвязанной фракции в зависимости от исследуемых отделов мозга. В мозжечке, продолговатом мозгу, сером, белом веществе больших полушарий, мозолистом теле, среднем мозгу величина У. А. в растворимой фракции выше по сравнению с таковой мембранной фракции примерно в 2 раза, в то время как в гиппокампе, стриатуме, гипоталамусе и гипофизе—не более чем в 1,5 раза.

Анализ полученных результатов позволяет условно разделить исследуемые отделы по активности в них карбоксипептидазы Н на четыре группы в порядке уменьшения активности: 1—гипофиз; 2—гипоталамус, гиппокамп, стриатум, мозолистое тело, серое вещество больших полушарий; 3—мозжечок, средний мозг, продолговатый мозг, белое вещество больших полушарий, серое вещество поясничного утолщения; 4—белое вещество, передние и задние корешки поясничного утолщения.

По соотношению активности фермента в растворимой и мембраносвязанной фракциях исследуемые отделы группируются в основном в том же порядке, что и по активности в гомогенате за исключением мозолистого тела и серого вещества больших полушарий, которые в этом случае попадают не во вторую, а в третью группу. В целом активность фермента выше в отделах, характеризующихся скоплением нейронов и ниже в проводящих путях.

Распределение карбоксипептидазы Н в ЦНС, по-видимому, зависит как от функциональной, так и от структурной организации тех или иных отделов мозга. Высокая активность фермента в гипофизе объясняется тем, что она имеет непосредственное отношение к процессингу секретируемых пептидов этого отдела [8, 9]. Предположение о роли карбоксипептидазы Н в процессинге регуляторных пептидов в таких отделах, как гипоталамус, гиппокамп, стриатум, не лишены основания в силу того, что в них обнаруживается относительно высокое содержание нейропептидов, например, энкефалинов [6, 13].

Таким образом, полученные нами данные подтверждают предположения ряда авторов о том, что карбоксипептидаза Н относится к ферментам процессинга пептидов мозга [7, 10].

REGIONAL DISTRIBUTION OF CARBOXYPEPTIDASE H IN THE CATS CNS

VERNIGORA A. N., GHENGHIN M. T., SAVCHENKO R. P.

State Pedagogical Institute, Penza

Dramatic differences of regional distribution of carboxypeptidase H activity were found in the cat brain and spinal cord. Pituitary gland is characterized by the highest enzyme activity.

Enzyme activities were found to be the smallest in CNS areas containing the fibers bundles. Two forms of enzyme were detected: soluble and membrane-bound forms. The ratios between these two forms were different within CNS areas studied. However membrane-type enzyme activity predominated in all CNS areas.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Hales C. N.* FEBS Lett., v. 94, № 1, p. 10—18, 1978.
2. *Дмитриев А. Д.* Итоги науки и техники, ВИНИТИ, Фармакол. и химиотерапевтические средства. т. 13, с. 7—49, 1982.
3. *Turner A. J.* Trends Neurosci., v. 7, № 7, p. 258—261, 1984.
4. *Григорьянц О. О., Гомазков О. А.* Вopr. мед. химии, т. 32, № 3, с. 15—20, 1986.
5. *Гензин М. Т., Вернигора А. И.* Укр. биохим. журн. т. 61, № 3, с. 62—66, 1989.
6. *Lunch D. R., Snyder S. H.* Ann. Rev. Biochem., v. 55, p. 773—779, 1986.
7. *Fricke L. D., Snyder S. H.* Proc. Natl. Acad. Sci., USA, v. 79, p. 3886—3890, 1982.
8. *Fricke L. D., Snyder S. H. J.* Biol. Chem., v. 258, p. 10955—10959, 1983.
9. *Supattapone S., Fricke L. D., Snyder S. H. J.* Neurochem., v. 42, № 4, p. 1017—1023, 1984.
10. *Skidgel R. A.* Trends Sci., v. 9, № 8, p. 299—304, 1988.
11. *Lowry O. H., Rosebrough M. J., Farr A. L., Randall R. J.* Biol. Chem., v. 193 № 1, p. 265—275, 1951.
12. *Ойвин Н. А.* Патол физиология и эксперим. медицина, т. 4, № 4, с. 76—85, 1960.
13. Энkeфалины мозга крыс. Распределение и биосинтез. (Х.—Ю. Т. Янг, Дж. С. Хонг, В. Фратта, Е. Коста/Эндорфины) Под ред. Э. Коста, М. Трабукки, с. 155—164, 1981, М., Мир.

Поступила 4. VI. 1991