

УДК 577.156:612.8.015

**ВЛИЯНИЕ ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА
НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н
(КФ.3.4.17.10) ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС****ГЕНГИН М. Т., ВЕРНИГОРА А. Н.**

Пензенский государственный педагогический институт им. В. Г. Беллинского

Установлено, что при однократном эмоционально-болевым стрессе в отделах мозга крыс имеет место повышение активности карбоксипептидазы Н, особенно в гипофизе и гипоталамусе, что при хроническом эмоционально-болевым стрессе сменяется тенденцией к нормализации активности фермента. Предполагается участие последнего в формировании механизма стрессорных реакций и возможная роль его растворимой и мембраносвязанной форм в процессинге секторных пептидов и нейропептидов, обладающих центральным действием соответственно.

В развитии стрессорных реакций и адаптации к ним вовлекаются стресс-пептиды гипоталамуса, гипофиза [1, 2] и другие, в том числе и опиоидные пептиды [3]. Механизмы ферментативного обеспечения обмена нейропептидов при стрессе практически не изучены. Нейропептиды синтезируются в виде предшественников, из которых при избирательном протеолизе образуются активные пептиды [4]. На конечных этапах процессинга пропептидов участвует карбоксипептидаза Н—фермент, отщепляющий основные аминокислоты с С-конца пропептидов, в связи с чем он, как полагают [5], может контролировать образование биологически активных пептидов и таким образом вовлекаться в развитие стрессорных реакций. Подтверждением этому служат данные об относительно высокой активности этого фермента в гипофизе [5]—отделе, ответственном за синтез стресс-пептидов.

В представленной работе исследовали влияние однократного и хронического эмоционально-болевого стресса на активность карбоксипептидазы Н в различных отделах головного мозга крыс.

Материалы и методы

Опыты проводили на самцах белых беспородных крыс массой 250—300 г, подразделенных на 3 группы: I—интактные (контроль), II и III—подвергнутые соответственно однократному и хроническому эмоционально-болевому стрессу. Животных II группы в течение 2-х ч через каждые 10 с в беспорядочном режиме подвергали воздействию

одного из трех факторов длительностью I с (вспышка света, звонок, электрокожное раздражение пороговой силы), а III группы в течение 30 дней ежедневно подвергали однократному эмоционально-болевого стрессу. Животных II и III групп деканитировали через 18 ч после окончания воздействия, извлекали головной мозг и разделяли его на отделы.

Мембранную и растворимую фракции получали центрифугированием гомогената, приготовленного на 50 мМ натрий-ацетатном буфере, рН 5,6, в течение 60 мин 20000 g при 4°. Активность карбоксипептидазы Н определяли по методу Flicker, Snyder [6] с использованием в качестве субстрата дансил-фен-лей-арг. Белок определяли по Lowry и соавт. [7].

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента [8] и считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Как явствует из таблицы, при однократном эмоционально-болевого стрессе отмечалось достоверное повышение активности карбоксипептидазы Н всех фракций гипофиза, гипоталамуса и серого вещества мозга. В среднем мозгу этот сдвиг наблюдался в гомогенате и мембранной фракции, в стриатуме—в гомогенате, в гиппокамне—в мембранной фракции. В растворимой фракции среднего мозга, мембранной и растворимой фракциях стриатума и гомогенате гиппокамня достоверных изменений активности карбоксипептидазы Н не обнаруживалось. В растворимой фракции гиппокамня имело место некоторое понижение активности фермента.

Таким образом, в целом, однократное развитие эмоционально-болевого стресса сопровождается повышением активности изученного фермента, что хорошо коррелирует с данными об увеличении содержания и секреции ряда нейропептидов при стрессе [1, 2, 9—11]. По степени повышения активности фермента отделы располагались в следующем порядке: гипофиз (на 59%), гипоталамус (на 46%), серое вещество (на 38%), средний мозг (на 28%), стриатум (на 20%). Наиболее существенное повышение активности карбоксипептидазы Н наблюдалось в гипофизе и гипоталамусе—отделах, отвечающих за синтез и секрецию стресс-пептидов [1], что, вероятно, свидетельствует о вовлечении фермента в процессинг этих пептидов.

При хроническом эмоционально-болевого стрессе активность карбоксипептидазы Н в гипофизе во всех фракциях отделов мозга была достоверно выше, чем в норме, а в гомогенате и растворимой фракции—ниже, чем при однократном эмоционально-болевого стрессе (см. таблицу). В гипоталамусе активность фермента повсюду была выше, чем в норме, в гомогенате достоверно ниже по сравнению с однократным эмоционально-болевым стрессом, в гомогенате же стриатума активность карбоксипептидазы Н не отличалась от нормы. В сером веществе и гиппокамне активность фермента также не отличалась от нормы.

Таблица

Влияние однократного и хронического эмоционально-болевого стресса на активность карбоксипептидазы II в отделах мозга крыс
(нМ дансил-фен-лей, образованности за 1 мин инкубации на 1 мг ткани (1) и на 1 мг белка (2));

Группа животных	Гипофиз		Гипоталамус		Средний мозг		Стриатум		Гиппокамп		Серое вещество		
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	
Норма (1)	Г	1,7± 0,1	15,6± 1,1	0,074± 0,007	0,91± 0,09	0,071± 0,003	0,72± 0,03	0,056± 0,004	0,61± 0,04	0,104± 0,003	1,17± 0,03	0,040± 0,003	0,46± 0,03
	Р	0,30± 0,03	9,3± 0,9	0,0087± 0,0006	1,18± 0,08	0,0118± 0,0006	1,30± 0,07	0,0110± 0,0008	1,55± 0,11	0,0167± 0,0013	2,11± 0,17	0,0100± 0,0003	1,06± 0,03
	М	0,45± 0,04	8,9± 0,9	0,065± 0,007	0,77± 0,10	0,051± 0,003	0,65± 0,04	0,050± 0,004	0,64± 0,05	0,037± 0,006	0,89± 0,08	0,034± 0,003	0,47± 0,04
Однократный стресс (2)	Г	2,7± 0,1	21,5± 0,9	0,108± 0,014	1,33± 0,05	0,091± 0,003	0,52± 0,03	0,067± 0,003	0,74± 0,09	0,104± 0,006	1,17± 0,07	0,055± 0,003	0,63± 0,03
	Р	0,53± 0,03	16,6± 0,9	0,0118± 0,0004	1,59± 0,08	0,0113± 0,0005	1,24± 0,07	0,0104± 0,0010	1,46± 0,14	0,0140± 0,0013	1,77± 0,16	0,0132± 0,0005	1,40± 0,05
	М	0,60± 0,11	11,5± 2,1	0,089± 0,006	1,25± 0,08	0,075± 0,010	0,96± 0,13	0,049± 0,001	0,63± 0,01	0,092± 0,001	1,21± 0,01	0,045± 0,003	0,62± 0,04
Хронический стресс (8)	Г	2,3± 0,1	20,9± 5,9	0,094± 0,005	1,04± 0,06	0,063± 0,007	0,64± 0,07	0,056± 0,005	0,62± 0,04	0,098± 0,007	1,10± 0,08	0,040± 0,003	0,46± 0,03
	Р	0,44± 0,03	13,8± 0,9	0,0174± 0,0008	2,35± 0,11	0,0110± 0,0003	1,21± 0,10	0,0116± 0,0009	1,63± 0,13	0,0169± 0,0016	2,14± 0,20	0,0100± 0,0014	1,06± 0,15
	М	0,66± 0,05	12,7± 1,2	0,074± 0,004	1,04± 0,06	0,066± 0,005	0,85± 0,06	0,050± 0,002	0,64± 0,03	0,071± 0,007	0,93± 0,09	0,034± 0,001	0,47± 0,02

Примечание: Г—гомогенат, Р—растворимая, М—мембранная фракции; М±m; n=5÷6; *—p<0,05, **—p<0,01, ***—p<0,001; *—p по отношению к норме, x—p по отношению к однократному эмоционально-болевному стрессу).

Таким образом, в отделах мозга крыс при хроническом эмоционально-болевым стрессе наблюдалась тенденция к нормализации активности карбоксипептидазы Н, причем в стриатуме, гиппокампе и сером веществе она не демонстрировала существенных отклонений от норм. Тенденция к нормализации активности карбоксипептидазы Н при хроническом эмоционально-болевым стрессе хорошо согласуется с представлениями о тенденции к нормализации уровня нейрорепептидов при адаптации к стрессу [1, 2, 9, 11].

Обращает на себя внимание тот факт, что если в гипоталамусе и сером веществе при однократном эмоционально-болевым стрессе активность растворимой и мембраносвязанной форм повышалась равномерно (на 36 и 37, 32 и 32% соответственно), то в гипофизе активность растворимой формы фермента повышалась примерно в 2,5 раза сильнее, чем мембраносвязанной (на 77 и 31% соответственно, таблица). В среднем мозгу активность карбоксипептидазы Н повышалась в мембранной фракции и не изменялась в растворимой, в гиппокампе при повышении активности фермента в мембранной фракции наблюдалось снижение активности в растворимой.

Итак, в различных отделах головного мозга однократный эмоционально-болевой стресс по-разному влияет на активность мембраносвязанной и растворимой форм фермента, что, по всей видимости, является свидетельством о существующих различиях этих форм фермента.

В настоящее время высказывается предположение о том, что растворимая и мембраносвязанная формы карбоксипептидазы Н участвуют в процессинге различных пептидов [12]. В гипофизе, синтезирующем секреторные пептиды и значительно интенсивнее при стрессе [1, 2], активность растворимой формы повышается несравненно больше, чем мембраносвязанной, что позволяет допустить вероятность вовлечения растворимой формы фермента в биосинтез этих пептидов. В среднем мозгу и гиппокампе, не синтезирующих секретлируемых пептидов, при стрессе отмечается повышение содержания энкефалинов, эндорфинов, вещества Р, пептида дельта-сна [9, 11], а также активности мембраносвязанной формы. Вместе с тем активность растворимой формы фермента либо не претерпевает заметных изменений, либо понижает, что указывает на возможное вовлечение мембраносвязанной формы карбоксипептидазы Н в процессинг предшественников этих пептидов. Отмечающиеся в гипоталамусе при стрессе значительное интенсифицирование синтеза кортикотропин-рилизинг фактора, секретлируемого в кровь и регулирующего секрецию адренокортикотропина гипофизом [1], сопровождается повышением содержания энкефалинов, вещества Р и других пептидов [9—11] с одновременным возрастанием активности растворимой и мембраносвязанной форм фермента примерно в одинаковых пределах.

Предположение о возможном вовлечении растворимой формы карбоксипептидазы Н в процессинг секреции пептидов, а мембраносвязанной — пептидов, обладающих центральным действием, подтверждается и тем фактом, что в тканях, продуцирующих секреторные

пептиды (β -клетки поджелудочной железы, хромоаффинные клетки надпочечников, гипофиз), растворимая форма составляет 90, 70 и 50% от общей активности, тогда как в отделах головного мозга содержание растворимой формы колеблется от 18—20 до 30—35% [13, 14].

Таким образом, весьма вероятно вовлечение карбоксипептидазы H в развитие стрессорных реакций, а хорошая корреляция изменений активности фермента со сдвигами уровня нейротензинов является подтверждением возможного участия карбоксипептидазы H *in vivo* в реакции превращений предшественников биологически активных пептидов. При этом не исключено вовлечение растворимой формы фермента в процессинг секретируемых пептидов, обладающих центральным действием.

Исходя из вышесказанного, представляло интерес изучение особенностей растворимой и мембраносвязанной форм карбоксипептидазы H при различных физиологических и патологических состояниях организма, что может быть полезным как для современного понимания биологической роли фермента и механизмов его регуляции *in vivo*, так и для выяснения путей формирования новых статусов функционирования энзимов, характерных для стартирования, развития и генерализации болезненного процесса.

INFLUENCE OF EMOTIONAL-ALGESIC STRESS ON THE ACTIVITY OF CARBOXYPEPTIDASE H (EC 3.4.17.10) OF RAT BRAIN

GENGIN M. T., VERNIGORA A. N.

State Pedagogical Institute, Penza

It is established that carboxypeptidase H activity during single-dose emotional-algesic stress increases in region of rat brain, the largest increasing of enzyme activity is observed in pituitary and hypothalamus. Tendency to normalization of enzyme activity during chronic emotional-algesic stress is observed. It is supposed that carboxypeptidase H is involved in the development of stress reaction, as well as that soluble forms of the enzyme can take part in the processing of secretory peptides, and the membrane-bound ones can take part in the processing of neuropeptides which have central action.

ЛИТЕРАТУРА

1. Makara G. B., Palkovits M., Szentagothai J. Selye's guide to stress research (ed. Selye H.). New York, Van Nostrand Reinhold Co., p. 280—337, 1980.
2. Лишманов Ю. Б., Трифонова Ж. В., Цибин А. И. и др. Бюл. эксперим. биол., т. 53, № 4, с. 422—424, 1987.
3. Слепушкин В. Д., Лишманов Ю. Б., Золов Г. К., Прун Н. А. Успехи физиол. наук, т. 16, № 4, с. 106—118, 1985.
4. Lynch D. R., Snyder S. H. Ann. Rev. Biochem., v. 55, Calif., Pale Alto, p. 773—799, 1986.
5. Fricker L. D. Trends Neurosci., v. 8, № 5, p. 210—214, 1985.

6. *Fricker L. D., Snyder S. H.* Procl. Natl. Acad. Sci. USA, v. 79, p. 3886—3890, 1982.
7. *Lowry O. H., Rosebrought N. J., Farr A. G., Randall R. J.* J. Biol. Chem., v. 193, № 1, p. 265—275, 1951.
8. *Ойвин И. А.* Пат. физиология и эксперим. медицина т. 4, № 4, с. 76—85, 1969.
9. *Тигранян Р. А.* Нейрохимия, т. 6, № 1, с. 63—71, 1987.
10. *Салиева Р. М., Конлик Е. В., Каменов З. А., Полетаев А. Б.* Бюл. эксперим. биол., т. 56, № 9, с. 264—266, 1988.
11. *Oehme P.* Wiss. Beitr. M.—Luther Univ./Wittenberg P.—Halle, v. 32, p. 179—190, 1988.
12. *Гомазков О. А., Григорьянц О. О.* Успехи соврем. биол., т. 108, № 1 (4), с. 109—124, 1989.
13. *Davidson H. W., Hutton J. C.* Blochem. J., v. 245, p. 575—582, 1987.
14. *Supattapone S., Fricker L. D., Snyder S. H.* J. Neurochem., v. 42, p. 1017—1023, 1984.

Поступила 18. XII 1991