**Влияние атропина на активность карбоксипептидазы и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы в отделах мозга и надпочечниках крыс**

Изучено влияние однократного воздействия атропина на активность карбоксипептидазы Н и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы – ферментов, участвующих в конечной стадии образования биологически активных нейропептидов из предшественников. Наблюдалось длительное, сохраняющееся по крайней мере в течение 72 ч снижение активности исследуемых ферментов. Предполагается, что снижение активности исследуемых ферментов может быть одним из механизмов снижения уровня нейропептидов при действии высоких доз атропина.

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

Холинотропные препараты оказывают свое действие практически на все регуляторные системы. Особый интерес представляет изучение их взаимодействия с пептидергической системой, поскольку нейропептиды участвуют в регуляции разнообразных нейрофизиологических процессов и соматических функций, в том числе тех, которые нарушаются при отравлении холиноблокаторами [1, 2, 3]. Общепризнано, что первичная фармакологическая реакция центральных холинотропных препаратов связана с активацией или блокированием холинорецепторов [4]. Однако многообразие фармакологических эффектов (в частности, транквилизирующее, анальгезирующее влияние и т.д.) препаратов этой группы трудно объяснить только с этой позиции. Исследования показали, что действие этих препаратов на обмен медиаторов (норадреналина, серотонина, дофамина) [5], фосфолипидов и синтез белка [6] не дает возможности в полной мере объяснить механизм их действия.

Имеется большое количество литературных данных об изменении концентрации регуляторных пептидов в мозге и сыворотке крови животных при действии холинолитиков [7, 8]. Однако молекулярные механизмы действия холинотропных препаратов на уровень биологически-активных пептидов не изучены.

Активная форма регуляторных пептидов образуется в результате протеолитического процессинга пропептидов. На конечных стадиях этого процесса, в результате которого образуются биологически активные пептиды, участвуют основные карбоксипептидазы, в частности карбоксипептидаза Н (КПН, КФ 3.4.17.10) и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемая карбоксипептидаза (ФМСФ-КП) [9, 10]. КПН локализована в секреторных везикулах и вовлекается в процессинг предшественников многих регуляторнгых пептидов [9, 10]. ФМСФ-КП – недавно описанный фермент [10], субстратная специфичность и тканевая локализация которого позволяет предположить возможность его вовлечения в обмен ряда биологически активных пептидов, в особенности опиоидных [10]. Однако биологическая роль этого фермента во многом остается не ясной.

В связи с этим, целью данной работы было изучение активности КПН и ФМСФ-КП при однократном введении атропина в отделах головного мозга и надпочечниках крыс, характеризующихся высоким уровнем регуляторных пептидов.

Материалы и методы

Опыты выполнены на самцах белых беспородных крыс массой 200–300 г. Атропин вводили внутрибрюшинно в физрастворе в дозе 2,5 мг/кг. Контрольной группе животных вводили равное количество 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, рН 5,6, в соотношении 1: 50 (вес: объем). В полученном гомогенате определяли активность КПН и ФМСФ-КП флюорометрическим методом L.D. Fricker and S.H. Snyder [11], содержание белка методом Лоури [12].

Активность КПН оценивали по гидролизу дансил-Phe-Ala-Arg при рН 5.6 как ингибируемую высокоспецифичным ингибитором фермента гуанидиноэтилмеркаптоянтарной кислотой (ГЭМЯК) [11], ФМСФ-КП по гидролизу дансил-Phe-Leu-Arg при рН 5.6 как ингибируемую ФМСФ [10]. 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 37oC, затем вносили 50 мкл предварительно нагретого до 37oC раствора субстрата (концентрация в пробе 42 мкМ), приготовленного на том же буфере и инкубировали в течении 60 мин при 37oC. Реакцию останавливали прибавлением 50 мкл 1М 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 1000 об/мин.

Флюоресценцию хлороформной фазы измеряли на флюориметре ФМЦ‑2 при λex=360 нм и λem=530 нм в кювете толщиной 1 см. В качестве стандарта использовали 2 мкМ раствор дансил-фенала в хлороформе.

Активность фермента определяли как разность прироста флюоресценции в пробах, не содержащих и содержащих ингибитор, и выражали в нмоль продукта, образовавшегося за 1 минуту инкубации в пересчете на 1 мг белка.

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t‑критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение**

Введении атропина в дозе 2,5 мг/кг вызывало снижение активности КПН в гипофизе через 0,5 и 4 ч после инъекции (рис. 1). 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 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 фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы в отделах мозга и надпочечниках крыс представлены на рис. 2. 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 у контрольной группы. 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.

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 [10, 11]. По-видимому, КПН принадлежит преобладающая роль в процессинге большинства пептидов – тропных гормонов, окситоцина, вазопрессина, атриального натрийуретического пептида, вещества Р и др. [10, 11]. ФМСФ-КП, вероятно, участвует в процессинге опиоидных пептидов, синтезирующихся в гипофизе – энкефалинов и β-эндорфина – уровень которых по данным других авторов [5, 7] 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 [5, 7, 13, 14]. 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 подвержена влиянию холинергической системы [13, 14]. Значительное снижение активности КПН, участвующей в образовании активных форм этих пептидов из предшественников [9, 10], по всей видимости, обеспечивает снижение уровня аргинин-вазопрессина и окситоцина атропином [7].

Таким образом, ФМСФ-КП, как и КПН, вероятно, принадлежит важная роль в регуляции уровня активных форм нейропептидов при введении атропина. 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.

**Список литературы**

1. Судаков С.К. // Успехи совр. биол. 1988. **105**., №1. С. 100 – 106.

2. Laubie M., Schmitt H. // J. Pharmacol. 1985. **16**., №2. P. 69 – 94.

3. Charpali S. at al. // Brain Res. 1988. **450**., №1 – 2. P. 124 – 130.

4. **Caulfield M. P, Nigel J.M.**// Pharm. Reviews. – 1998. – 50. №2. – P. 279–290.

5. Громов Л.А., Лохвицкая К.Н. // Фармакология и токсикология. – К.: Здоров’я, 1971. Т. 6. – С. 24–26.

6. Елаев Н.Р., Иванова А.И., Крылов С.С. // Докл. АН СССР. – 1973. – 213, №5. – С. 1201–1202.

7. Крылов С.С., Ливанов Г.А., Петров А.Н., Семенов Е.В., Спринц А.М., Бучко В.М. Клиническая токсикология лекарственных средств. Холинотроп-ные препараты. Санкт-Петербург.: Лань, 1999. 160 с.

8. Громов Л.А., Жила В.А. // Укр. биохим. журн. 1986. **58**., №6. С. 61 – 63.

9. Beinfeld M.C. // Endocrine. 1998. **8**., №1. P. 1 – 5.

10. Вернигора А.Н., Генгин М.Т. // Укр. биохим. журн. 1998. **70**., №2. С. 3 – 4.

11. Fricker L.D., Snyder S.H. // J. Biol. Chem. – 1983. – 258, №18. – P. 10950–10955.

12. Lowry O.H., Rosebrought N.J., Farr A.G., Randall R.J. // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, №1. – P. 265–275.

13. Andersson K., Eneroth P., Fuxe K., Harfstrand A. // Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. – 1998. – 337, №2. – P. 131–139.

14. Pitkдnen A., Beal M.F., Sirviц J., Swartz K.J., Mдnnistц P.T., Riekkinen P.J. // Neuropeptides. – 1989. – 14. – P. 197–207.

**Effect of single atropine administration on the carboxypeptidase h and phenylmethylsulphonilfluoride-inhibited carboxypeptidase activities in rat brain departments and sdrenal**

The effect of a single atropine administration on the activities of carboxypeptidase H and phenylmethylsulphonilfluoride-inhibited carboxypeptidase part in the final stage of formation of biologically active neuropeptides from precursors was studied. Changes in the enzymes’ activities after administration were evident during at least 72 h. The results suggest that one of possible mechanisms of reduction of neuropeptide levels by atropine is suppression of activity of enzymes taking part in there metabolism – carboxypeptidase H and phenylmethylsulphonilfluoride-inhibited carboxypeptidase.