

КОРОТКІ ПОВІДОМЛЕННЯ

УДК 612.822.1+612.45.015.3

ВЛИЯНИЕ АТРОПИНА НА АКТИВНОСТЬ АНГИОТЕНЗИНПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА И КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ N В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС

М. Т. ГЕНГИН, В. Б. СОЛОВЬЕВ, В. А. СМЕТАНИН, А. А. ПАЗЯЛОВА, О. В. СИМКИНА,
А. Н. КОНОВАЛОВ, Д. С. КУЗИЧКИН, Н. К. ШАШКИНА, Н. М. ГЕНГИНА, К. Б. СУББОТИНА

Пензенский государственный педагогический университет, Россия;
e-mail: solowew@rambler.ru

Вивчено вплив одноразової дії атропіну на активність ангіотензинперетворювального ферменту та карбоксипептидази N – ферментів обміну регуляторних пептидів. Зміна активності ферментів зберігається майже упродовж 72 годин після введення. Обговорюється роль даних ферментів у метаболізмі регуляторних пептидів у разі дії атропіну.

К л ю ч о в і с л о в а: ангіотензинперетворювальний фермент, карбоксипептидаза N, атропін, нейропептиди.

Холинотропные препараты оказывают действие практически на все регуляторные системы. Особый интерес представляет изучение их взаимодействия с пептидергической системой, поскольку нейропептиды участвуют в регуляции нейрофизиологических процессов и соматических функций, в том числе тех, которые нарушаются при отравлении холиноблокаторами [1–3]. Имеется большое количество данных литературы об изменении концентрации опиоидных пептидов в мозгу и сыворотке крови животных под действием холинолитиков [4, 5]. Однако молекулярные механизмы действия холинотропных препаратов на уровень биологически активных пептидов не изучены. Активная форма регуляторных пептидов образуется в результате протеолитического процессинга пропептидов. В конечных стадиях этого процесса, в результате которого образуются биологически активные пептиды, важную роль играют экзопептидазы [6, 7]. Предполагают, что эти ферменты участвуют и в инактивации нейропептидов [8]. В сыворотке крови такими ферментами являются карбоксипептидаза N (3.4.17.3) и ангиотензинпревращающий фермент (3.4.15.1). Эти ферменты принимают участие в обмене многих пептидов: энкефалинов, кининов, ангиотензина и др. [6–10].

Цель нашей работы – исследование влияния однократного воздействия *m*-холиноблокатора атропина на активность карбоксипептидазы N и ангиотензинпревращающего фермента в сыворотке крови крыс.

Материалы и методы

В эксперименте использовали самцов белых беспородных крыс с массой тела 150–300 г. Атропин вводили внутрибрюшинно в дозе 2,5 мг/кг. Контрольной группе животных вводили равное количество физраствора. Крыс декапитировали через 30 мин, 4, 24 и 72 ч после инъекции, собирали кровь и отделяли сыворотку. Низкомолекулярные нингидринположительные компоненты удаляли пропусканием сыворотки через колонку с сефадексом G-25, затем сыворотку разводили физраствором 1 : 1.

Активность ангиотензинпревращающего фермента определяли по отщеплению Gly-Arg от карбоксибензоил-Gly-Gly-Arg при pH 8,2 с использованием каптоприла в качестве ингибитора. Опытные пробы содержали 40 мкл разведенной сыворотки и 20 мкл 100 мМ Tris-HCl. Контрольные пробы содержали каптоприл в конечной концентрации 10 мкМ. Активность карбоксипептидазы N определяли по отщеплению Arg от карбоксибензоил-Gly-Arg как Co²⁺-активируемую. В данном случае опытные пробы содержали 20 мкл 3,5 мМ CoSO₄ в 100 мМ Tris-HCl, pH 7,6 и 40 мкл сыворотки. Контрольные пробы содержали 30 мкл буфера и 40 мкл сыворотки. Пробы инкубировали 8 мин при 37 °С. Затем в пробы с ангиотензинпревращающим ферментом вносили по 10 мкл карбоксибензоил-Gly-Gly-Arg (концентрация в пробе 3,65 мкМ) в том же буфере. В опытные пробы с карбоксипептидазой N вносили по 10 мкл карбоксибензоил-Gly-Arg. Пробы инкубировали 120 мин при 37 °С. Реак-

цию останавливали прибавлением 30 мкл 10%-го раствора трихлоруксусной кислоты. Осадок отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 4000 об./мин. Затем отбирали по 50 мкл надосадочной жидкости и определяли нингидриновым методом количество образовавшегося продукта по приросту свободных аминогрупп [11]. Активность ферментов выражали в нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин инкубации из расчета на 1 мг белка. Количество белка в пробе определяли по Lowry [12].

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

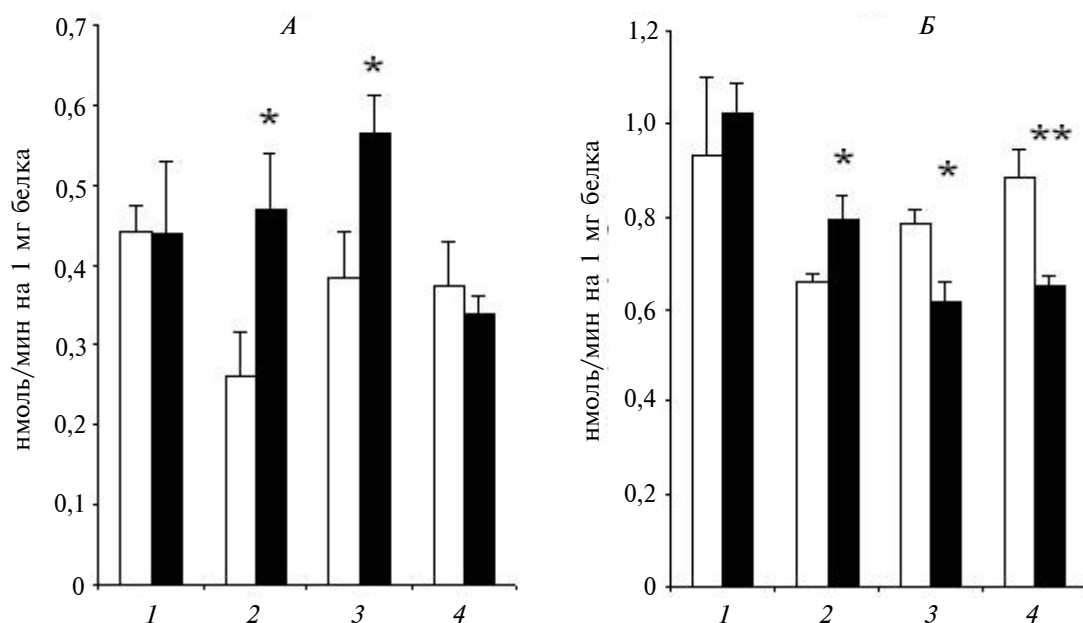
Результаты исследования свидетельствуют, что введение атропина вызывает повышение активности ангиотензинпревращающего фермента в сыворотке через 4 и 24 ч после инъекции. Активность карбоксипептидазы N возрастает через 4 ч после введения атропина, а через 24 и 72 ч снижается по сравнению с контролем (рисунок).

Таким образом, воздействие атропина вызывает заметное повышение активности ангиотензинпревращающего фермента. Известно, что введение атропина в токсичных дозах приводит к выраженному снижению уровня энкефалинов и β -эндорфина в мозгу и крови животных [4, 5]. Поскольку под влиянием атропина снижается

рецепторное связывание опиоидных пептидов [3], то можно предположить, что несвязанные с рецепторами пептиды значительно легче подвергаются ферментативной деградации пептидазами и поэтому их содержание снижается. В настоящее время не вызывает сомнений тот факт, что ангиотензинпревращающий фермент вносит значительный вклад в деградацию этих пептидов [13], причем по данным Е. А. Brownson с соавторами [8] доля участия ангиотензинпревращающего фермента в деградации энкефалинов составляет более 50%. Таким образом, одним из механизмов снижения уровня опиоидных пептидов в сыворотке крови под действием атропина вероятно может быть повышение активности одного из ферментов их деградации – ангиотензинпревращающего фермента.

Кратковременное повышение активности карбоксипептидазы N через 4 ч после введения атропина происходит, вероятно, за счет снижения ингибирующего действия энкефалинов [12]. Поскольку карбоксипептидаза N является одним из ферментов процессинга энкефалинов [12], то дальнейшее снижение ее активности через 24 и 72 ч может, по всей видимости, приводить к снижению уровня опиоидных пептидов при воздействии атропина.

Полученные в работе данные позволяют предположить, что вызванные введением атропина изменения в активности ангиотензинпрев-



Влияние атропина на активность ангиотензинпревращающего фермента (А) и карбоксипептидазы N (Б) в сыворотке крови крыс ($M \pm m$, $n = 4-6$). Здесь: 1 – 0,5 ч; 2 – 4 ч; 3 – 24 ч; 4 – 72 ч, □ – контроль, ■ – атропин 2,5 мг/кг, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

рашающего фермента и карбоксипептидазы N являются одним из факторов, обуславливающих изменения в уровне регуляторных пептидов.

ATROPINE EFFECT ON ACTIVITY OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME AND CARBOXYPEPTIDASE N IN THE SERUM OF RATS

M. T. Gengin, V. B. Solovey, V. A. Smetanin, A. A. Pazyalova, O. V. Simkina, A. N. Kononov, D. S. Kuzichkin, N. K. Shashkina, N. M. Gengina, K. B. Subbotina

Penza State Pedagogical University, Russia;
e-mail: solowew@rambler.ru

S u m m a r y

The effect of a single atropine administration on the activities of angiotensin-converting enzyme and carboxypeptidase N taking part in peptides metabolism was studied. Changes in the enzymes activities after administration were evident during at least 72 h. The role of these enzymes in the metabolism of neuropeptides under the effect of atropine was discussed.

К е у w o r d s: angiotensin-converting enzyme, carboxypeptidase N, atropine, neuropeptides.

1. *Судаков С. К.* // Успехи соврем. биол. — 1988. — **105**, N 1. — С. 100–106.
2. *Laubie M., Schmitt H.* // J. Pharmacol. — 1985. — **16**, N 2. — P. 69–94.

3. *Charpali S. et al.* // Brain Res. 1988. — **450**, N 1–2. — P. 124–130.
4. *Крылов С. С., Ливанов Г. А., Петров А. Н. и др.* Клиническая токсикология лекарственных средств. Холинотропные препараты. Санкт-Петербург: Лань, 1999. 160 с.
5. *Громов Л. А., Жила В. А.* // Укр. биохим. журн. — 1986. — **58**, N 6. — С. 61–63.
6. *Beinfeld M. C.* // Endocrinology. — 1998. — **8**, N 1. — P. 1–5.
7. *Вернигора А. Н., Генгин М. Т.* // Укр. биохим. журн. — 1998. — **70**, N 2. — С. 3–4.
8. *Brownson E. A., Abbruscato T. J., Gillespie T. J. et al.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1994. **270**, N 2. — P. 675–680.
9. *Нукишин Н. Н., Вернигора А. Н., Генгин М. Т.* // Укр. биохим. журн. 1994. — 66, № 5. — С. 51–55.
10. *Hurst P. L., Lovell-Smith C. J.* // Clin. Chem. — 1981. — **27**. — P. 2048–2052.
11. *Lee P. N., Takahaski T. N.* // Analyt. Biochem. — 1966. — **14**, N 1. — P. 71–77.
12. *Lowry O. H., Rosebrought N. J., Farr A. G., Randall R. J.* // J. Biol. Chem. — 1951. — **193**, N 1. — P. 265–275.
13. *Shibanoki S., Weinberger S. B., Ishikawa K., Martinez J. L.* // Reg. Peptides. — 1991. — **32**. — P. 267–278.
14. *Лишманов Ю. Б., Трифонова Ж. В., Цибин А. Н.* // Бюлл. эксперим. биол. медицины. — 1987. — **103**, N 4. — С. 422–424.

Получено 10.04.2005