

ВЛИЯНИЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО ЭМОЦИОНАЛЬНО-БОЛЕВОГО СТРЕССА НА АКТИВНОСТЬ КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ Н В ТКАНЯХ САМОК КРЫС НА РАЗНЫХ СТАДИЯХ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА

Вишнякова Ж.С.

Пензенский государственный университет, Медицинский институт, Пенза, Россия (440026, г. Пенза, ул. Красная, 40), e-mail: zhanna_2000@mail.ru

Изучено влияние однократного продолжительного эмоционально-болевого стресса на активность карбоксипептидазы Н (КПН) в гипоталамусе, гипофизе, стриатуме, надпочечниках и половых железах самок белых беспородных крыс на разных стадиях эстрального цикла. Обнаружено, что острый стресс вызывал снижение активности карбоксипептидазы Н в гипофизе, гипоталамусе и стриатуме на стадиях проэструса и эструса, а в диэструсе в этих отделах активность фермента повышалась. В надпочечниках во время эструса воздействие стресса приводило к увеличению ферментативной активности. Разнонаправленное изменение активности КПН на разных стадиях цикла при стрессе связано с различной устойчивостью животных к воздействию стрессовых факторов в течение эстрального цикла. Высказывается предположение, что КПН вовлекается в определение различий в ответе на стресс, в адаптации и устойчивости к стрессирующему воздействию на разных стадиях эстрального цикла.

Ключевые слова: карбоксипептидаза Н, стресс, самки крыс, эстральный цикл.

EFFECT OF LONG EMOTIONAL PAIN STRESS ON ACTIVITY OF CARBOXYPEPTIDASE H IN TISSUES FEMALE RATS AT DIFFERENT STAGES ESTROUS CYCLE

Vishnyakova Z.S.

Penza State University Medical Institute, Penza, Russia (440026, Penza, st. Krasnaya, 40), e-mail: zhanna_2000@mail.ru

The article deals with the problem of effect of a single continuous emotional pain stress on the activity of carboxypeptidase H (CPH) in the hypothalamus, pituitary gland, striatum, adrenal glands and gonads of female albino rats at different stages of the estrous cycle. It was found that acute stress caused a reduction in activity of CPH in the pituitary, hypothalamus and striatum in the stages of proestrus and estrus. However diestrus increased in these parts of the enzyme activity. Opposite changes CPH activity at different stages of the cycle under stress due to the different resistance of animals to the effects of stress factors during the estrous cycle The stress increased the enzymatic activity in the adrenal gland. It is suggested that the CPH is involved in the determination of the differences in the response to stress, in adaptation and resilience to stressful effects at different stages of the estrous cycle.

Keywords: carboxypeptidase H, stress, female rats, estrous cycle.

Введение

Различия в стресс-реакции и устойчивости к стрессу у особей женского пола на разных стадиях эстрального цикла определяются разным содержанием гонадотропных гормонов, половых стероидов и глюкокортикоидов [1], опиоидных пептидов, вещества Р [11]. Важную роль в адаптации организма к стрессорному воздействию играют компоненты стресс-лимитирующих систем: энкефалины, вещество Р, пептид, вызывающий дельта-сон [3]. Уровень активных нейропептидов зависит от активности протеолитических ферментов, участвующих как в их процессинге, так и в инактивации [1]. Одним из ключевых ферментов процессинга ряда нейропептидов является карбоксипептидаза Н (КФ 3.4.17.10) (КПН), которая на последней стадии катализирует реакцию отщепления от пропептидов С-

концевых основных аминокислот. Участие КПН в образовании активных форм пептидов определяет интерес к этому ферменту.

Цель исследования - изучение активности карбоксипептидазы Н в тканях самок крыс на разных стадиях эстрального цикла.

Материалы и методы исследования

Опыты проводили на самках белых беспородных крыс массой 180–250 г. Животных разделили на три группы: проэструс, эструс и диэструс. Стадию эстрального цикла определяли по влагилицным мазкам. В каждой группе выделили две подгруппы: стрессированную и контрольную. Контролем служили интактные животные. Для моделирования острого эмоционально-болевого стресса крысам в течение 2 ч в беспорядочном режиме подавали один из трех сигналов: вспышка света, звук, электрокожное раздражение. После воздействия стресса самок декапитировали непосредственно после воздействия (0 ч), через 0,5, 4 и 18 часов после стресса. Активность КПН определяли флюорометрическим методом по Fricker L.D., Snyder S.H. [12] при pH 5,6 по отщеплению дансил-Phe-Ala от дансил-Phe-Ala-Arg как разность в накоплении продукта реакции в пробах, не содержащих и содержащих гуанидиноэтилмеркаптоянтарную кислоту, и выражали в нмоль дансил-Phe-Ala образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка. Содержание белка в пробах определяли методом Lowry [10]. Отличия между средними значениями признаков определяли с помощью t-критерия Стьюдента, достоверными считали различия при $p < 0,05$ [8]. Дисперсионный анализ проводили с помощью программы Statgraphics (версия 3.0) («STSC, Inc.», США) в режимах One-Way ANOVA и Multifactor ANOVA

Результаты исследования и их обсуждение

У контрольной группы животных в гипофизе и стриатуме активность карбоксипептидазы Н зависела и от стадии эстрального цикла (табл. 1).

Таблица 1. Активность КПН в тканях интактных самок крыс на разных стадиях эстрального цикла (нмоль дансил-фен-ала, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка; $M \pm m$; $n = 5 \div 6$; $^{\circ} - p < 0,05$, $^{oo} - p < 0,01$, $^{ooo} - p < 0,001$ относительно диэструса; $^x - p < 0,05$, $^{xx} - p < 0,01$, $^{xxx} - p < 0,001$ относительно эструса).

Отдел	Самки		
	Стадии эстрального цикла		
	Проэструс	Эструс	Диэструс
Гипофиз	1,229±0,143 ^{x,oo}	0,690±0,048 ^{oo}	0,445±0,040

Гипоталамус	0,211±0,012	0,247±0,011	0,238±0,019
Стриатум	0,168±0,015 ^o	0,195±0,012 ^o	0,153±0,013
Надпочечники	0,071±0,004	0,067±0,009	0,091±0,012
Половые железы	0,079±0,025	0,042±0,027	0,029±0,015

В гипофизе ферментативная активность была наиболее высокой в проэструсе, наиболее низкой – в диэструсе и промежуточной – в эструсе, причем активность в проэструсе была в 2,7 раза выше, чем в диэструсе. Активность КПН в стриатуме в проэструсе и эструсе выше, чем в диэструсе. В остальных исследованных отделах достоверных отличий не выявлено.

Существенные отличия, вероятно, связаны с более высоким уровнем синтеза и секреции биологически активных пептидов у самок крыс на этих стадиях полового цикла.

Динамика изменения активности фермента в эстральном цикле совпадает с динамикой изменения уровня секреции гонадотропных гормонов [1; 7], что может свидетельствовать о вовлечении КПН в процессинг предшественников гонадотропинов и, соответственно, в регуляцию эстрального цикла.

Воздействие острого эмоционально-болевого стресса продолжительностью 2 ч вызывало снижение активности КПН на стадии проэструс в гипофизе через каждый исследованный интервал времени после воздействия (рис. 1). Непосредственно после стресса активность фермента понижалась в 1,9 раза, через 30 мин – в 2,1 раза, а через 4 часа после воздействия в 3,1 раза. В гипоталамусе отмечено повышение активности фермента в проэструсе через 30 мин после стресса в 1,5 раза. В стриатуме наблюдалось увеличение активности карбоксипептидазы Н в проэструсе через 30 мин после стрессорного воздействия в 1,7 раза, в надпочечниках – через 4 ч в 1,4 раза.

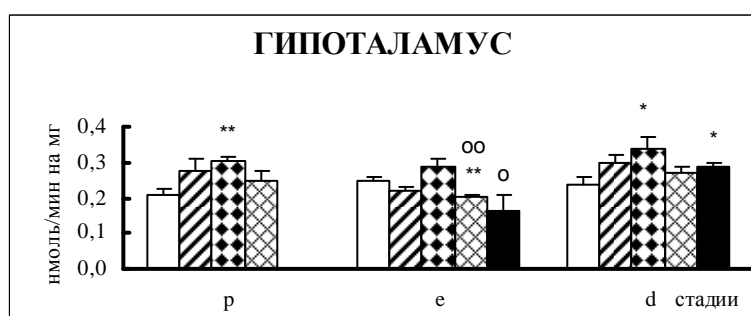
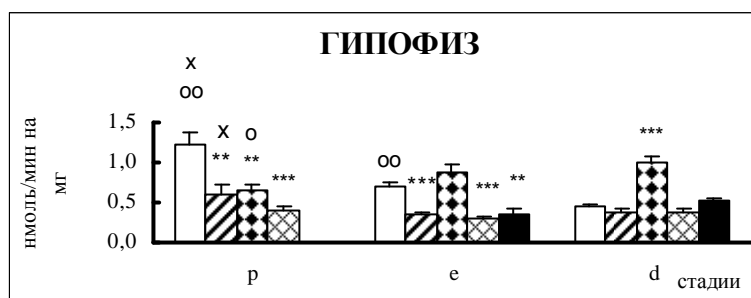
Во время эструса в гипофизе активность КПН была достоверно ниже по отношению к норме непосредственно после воздействия (0 ч), через 4 и 18 ч после стресса в 1,9, 2,2 и 2 раза соответственно. В гипоталамусе на стадии эструс через 4 ч после действия стрессовых факторов наблюдалось снижение активности фермента в 1,2 раза. В стриатуме продолжительный эмоционально-болевым стресс приводил к снижению уровня ферментативной активности через 0 ч и 18 ч после воздействия в 1,4-1,6 раза. В надпочечниках на стадии эструса активность повышалась в 1,8 раз через 30 мин после эмоционально-болевого стресса.

В диэструсе наблюдалось увеличение активности КПН по отношению к контрольным животным в гипофизе через 0,5 ч после стрессирования в 2,2 раза, в гипоталамусе – через 0,5 и 18 ч, в стриатуме – через 4 ч.

Согласно данным двухфакторного дисперсионного анализа активность КПН при воздействии стресса длительностью 2 ч зависела от стадии эстрального цикла в гипофизе, гипоталамусе и надпочечниках, время после стрессирования достоверно влияло на ферментативную активность в гипофизе, гипоталамусе и стриатуме. Влияние взаимодействия стадии эстрального цикла и времени после действия стрессорных факторов продолжительностью 2 ч на активность КПН наблюдалось только в гипофизе самок крыс (табл. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что у самок опытных крыс активность КПН при действии острого эмоционально-болевого стресса в большей степени изменялась в гипофизе, гипоталамусе и надпочечниках – отделах, в которых синтезируются стресс-пептиды [2; 4; 9]. Эти данные подтверждают предположение о вовлечении КПН в процессинг предшественников биологически активных пептидов, участвующих в ответе на стресс, и, соответственно, в развитие стрессорных реакций и адаптации [5; 6].

У самок крыс острый стресс на стадиях проэструса и эструса вызывал преимущественно снижение активности КПН в гипофизе, гипоталамусе и стриатуме, а в диэструсе в этих отделах активность фермента повышалась. В надпочечниках во время эструса воздействие стресса приводило к увеличению ферментативной активности. Вероятно, что разнонаправленное изменение активности КПН на разных стадиях цикла при стрессе (снижение активности во время проэструса, эструса и повышение – в диэструсе) связано с различной устойчивостью животных к воздействию стрессовых факторов в течение эстрального цикла [1; 7].



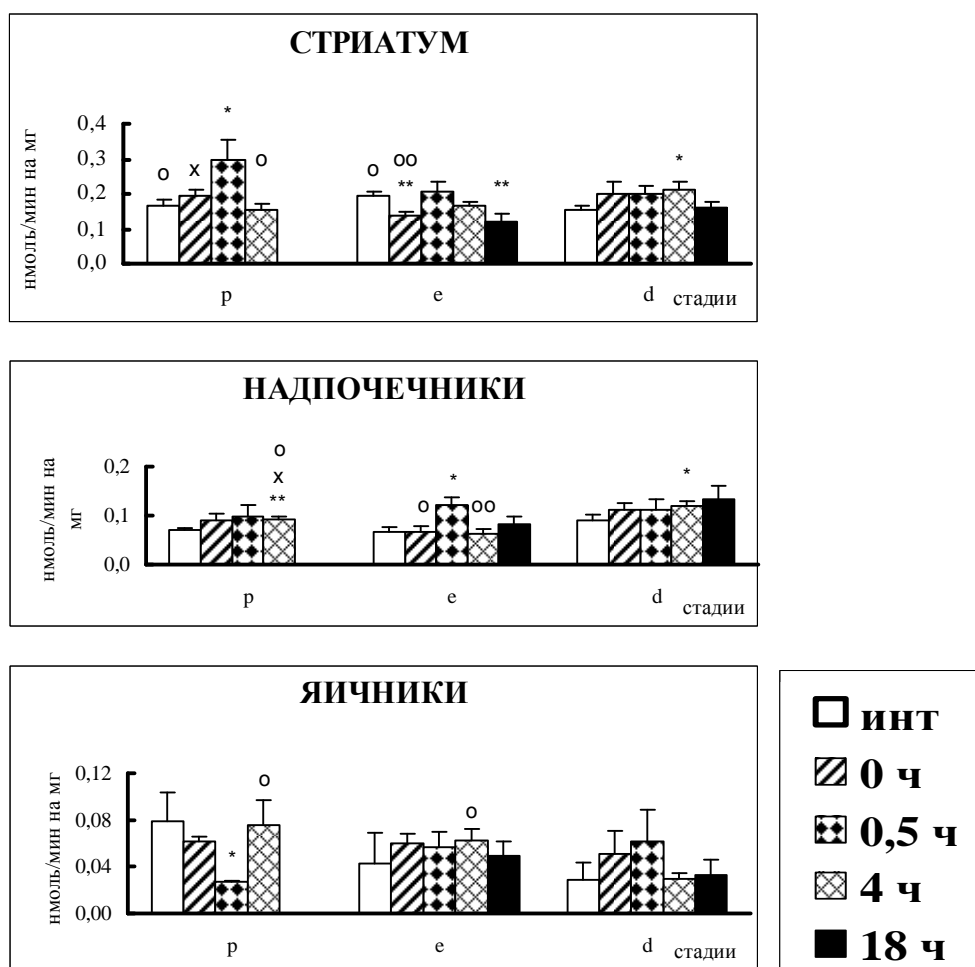


Рис. 1. Активность КПН в тканях крыс самок после воздействия стресса длительностью 2 ч ($M \pm m$; $n = 5 \div 6$; * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ относительно нормы; ^o – $p < 0,05$, ^{oo} – $p < 0,01$, ^{ooo} – $p < 0,001$ относительно диэструса; ^x – $p < 0,05$, ^{xx} – $p < 0,01$, ^{xxx} – $p < 0,001$ относительно эструса)

Таблица 2. Дисперсионный анализ влияния взаимодействия времени после воздействия стресса (2 ч) и стадии эстрального цикла на активность КПН (значения отношения Фишера: F_{Φ_1} – влияние стадии эстрального цикла, F_{Φ_2} – влияние времени после воздействия стресса, F_{Φ_3} – влияние взаимодействия времени после воздействия стресса и стадии эстрального цикла)

Отдел	F_{Φ_1}	F_{Φ_2}	F_{Φ_3}
Гипофиз	7,22**	16,13***	6,45***
Гипоталамус	5,42**	4,35**	1,17
Стриатум	0,90	3,12*	1,47
Надпочечники	5,19**	2,40	0,84
Яичники	1,41	1,43	2,03

Таким образом, КПН, вероятно, принадлежит важная роль в определении отличий в ответной реакции на стресс, в адаптации и устойчивости к стрессирующему воздействию в зависимости от стадии эстрального цикла.

Список литературы

1. Анищенко Т.Г. Половые аспекты проблемы стресса и адаптации // Успехи совр. биол. – 1991. – Т. 111, № 3. – С. 460-475
2. Ашмарин И.П., Стукалова П.В., Ещенко Н.Д. Биохимия мозга. - СПб. : Издательство Санкт-Петербургского университета, 1999. – 328 с.
3. Бондаренко Т.И., Милютина Н.П., Михалева Н.И., Носкова Н.В. Мембраностабилизирующий эффект дельта-сон индуцирующего пептида при стрессе // Бюл. экспер. биол. и мед. – 1990. – № 9. – С. 325-327.
4. Вернигора А.Н., Щетинина Н.В., Салдаев Д.А., Генгин М.Т. Распределение активности основных карбоксипептидаз в тканях лабораторных животных разных видов // Ж. эволюц. биохим. физиол. – 2002. – Т. 38, № 1. – С. 25-27.
5. Вернигора А.Н., Генгин М.Т., Макарова В.В. Влияние стрессовых факторов на активность карбоксипептидазы Н в отделах головного мозга крыс // Укр. биохим. журн. – 1992. – Т. 64, № 2. – С. 45-49.
6. Вернигора А.Н., Генгин М.Т., Никишин Н.Н. Об участии некоторых ферментов обмена нейропептидов в механизмах эмоционального стресса // Физиол. журн. им. Сеченова. – 1995. – Т. 81, № 5. – С. 103-112.

7. Вундер П.А., Андронов Е.В., Андропова Т.А. Стрессорные реакции и роль пола в их осуществлении // Успехи совр. биол. – 1999. – Т. 119, № 4. – С. 335-344.
8. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М. : Высш. шк., 1990. – 352 с.
9. Drolet G., Dumont E.C., Gosselin I., Kinkead R., Laforest S., Trottier J.F. Role of Endogenous Opioid System in the Regulation of the Stress-Response // Prog. Neuro-Psych. Biol. Psych. – 2001. – V. 25, N 4. – P. 729-741
10. Lowry O.H., Rosebrought N.J., Farr A.G., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – V. 193, N 1. – P. 265-275.
11. Potargowicz E., Traczyk W.Z. Role of substance P in central control of ovulation in female rats // Endocrine Regulations. – 1999. – N 33. – P. 161-167.
12. Supattapone S., Fricker L.D., Snyder S.H. Purification and characterization of membrane-bound enkephalin-forming carboxypeptidase, "enkephalin convertase" // J. Neurochem. – 1984. – V. 42, N 4. – P. 1017-1023.

Рецензенты:

Микуляк Н.И., д.м.н., профессор, зав. кафедрой «Физиология человека» Медицинского института, Пензенский государственный университет, г. Пенза.

Моисеева И.Я., д.м.н., профессор, зав. кафедрой «Общая и клиническая фармакология» Медицинского института, Пензенский государственный университет, г. Пенза.