

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

"ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ"

Факультет физико-математических и
естественных наук

Кафедра "Общая биология и
биохимия"

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль Биохимия

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО УПОТРЕБЛЕНИЯ АЛКОГОЛЯ НА
АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА РЕГУЛЯТОРНЫХ
ПЕПТИДОВ»**

Студент Измаилова Гулия Хайдаровна

Руководитель Гамзин С.С.

Нормоконтролёр Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 09.06.18 № 14)

Заведующий кафедрой Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отл. (протокол заседания ГЭК от 20.06.18 № 6)

Секретарь ГЭК Кручинина А.Д.

Пенза, 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1.ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Этиология хронического потребления алкоголя.....	7
1.2 Алкогольная интоксикация	9
1.2.1 Острая алкогольная интоксикация.....	9
1.2.2 Хроническая алкогольная интоксикация.....	10
1.3 Сопутствующие поражения органов желудочно – кишечного тракта.....	12
1.4 Сопутствующие поражения органов выделительной системы.....	15
1.5 Ферменты обмена регуляторных пептидов.....	17
1.5.1 Карбоксипептидаза Е	17
1.5.2 ФМСФ – ингибируемая карбоксипептидаза.....	19
1.5.3 Карбоксипептидаза М	20
1.6 Влияние этанола на активность ферментов обмена нейропептидов....	21
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	23
2.1 Материал и условия проведения исследований.....	24
2.2 Методы исследований.....	24
2.1.1 Метод определения активности карбоксипептидазы Е	25
2.1.2 Метод определения активности карбоксипептидазы М.....	25
2.1.3 Метод определения активности ФМСФ–ингибируемой карбоксипептидазы.....	25
2.2.4 Метод определения содержания белка.....	26
2.2.5 Статистическая обработка результатов исследования.....	26

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	27
3.1 Исследование активности карбоксипептидазы Е в тканях крыс.....	27
3.2 Исследование активности ФМСФ–ингибируемой карбоксипептидазы в тканях крыс.....	31
3.3 Исследование активности карбоксипептидазы М в тканях крыс.....	34
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	38
ВЫВОДЫ.....	40
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	41
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	42

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время проблема алкоголизма, является одной из самых значимых как для социальной, так и для медицинской областей жизни. Медицинские исследования отмечают негативные влияния этанола, как на весь организм человека, так и на отдельные органы в частности. Так длительное употребление алкоголя затрагивает в том числе пептидергические системы организма, вызывая ряд нарушений в работе нейропептидов, которые, в свою очередь, играют значительную роль в этиологии патогенеза данного заболевания.

При алкогольной интоксикации, прежде всего, наблюдаются изменения в обмене пептидов. Последний регулируется следующими ферментами карбоксипептидазой E, фенилметил–сульфонилфторид–ингибируемой карбоксипептидазой и карбоксипептидазой M. Данные карбоксипептидазы, выполняют процессы отщепления остатков аргинина и лизина с С–конца пептидов. Принимая участие в процессе модуляции и инактивации биологически активных пептидов, данные ферменты вызывают особый интерес для исследований. Выполняя функции гормонов, нейромедиаторов и нейромодуляторов пептиды регулируют многие реакции организма, в том числе принимая участие в патологических процессах, среди которых значимую роль представляет острая алкогольная интоксикация [19, 74, 88].

Установлено, что в прогрессировании интоксикации алкоголем имеют значение половые особенности. Предполагают, что такие различия тесно связаны с гормональными аспектами пола [44]. Так отличия могут проявляться в количестве потребления этилового спирта, в скорости формирования зависимости, а также в особенностях течения алкогольной интоксикации у разных полов [5, 19, 64, 65]. Интересно отметить, что исследование уровня карбоксипептидаз в организме при алкогольной интоксикации позволит в целом понять не только вовлечение ферментов в

данный процесс, но понимание в целом механизмов функционирования пептидэргических систем.

Таким образом, изучение этиологии алкоголизма связано в первую очередь с пониманием нейробиологических процессов, лежащих в его основе [80]. В этой связи представляется очень важным исследование активности основных карбоксипептидаз при острой алкогольной интоксикации, так как это может не только способствовать уточнению биологической роли этих ферментов, но и выяснению механизмов функционирования пептидэргических систем при данном патологическом состоянии.

Целью настоящей работы было изучение активности карбоксипептидазы Е, фенилметил–сульфонилфторид–ингибируемой карбоксипептидазы и карбоксипептидазы М в тканях самцов крыс при острой алкогольной интоксикации.

При выполнении работы были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние однократного введения физиологического раствора на активность карбоксипептидазы Е в тканях крыс.
2. Изучить влияние однократного введения физиологического раствора на активность фенилметил–сульфонилфторид–ингибируемой карбоксипептидазы в тканях крыс.
3. Изучить влияние однократного введения физиологического раствора на активность карбоксипептидазы М в тканях крыс.
4. Изучить влияние однократного введения этанола на активность карбоксипептидазы Е в тканях крыс.
5. Изучить влияние однократного введения этанола на активность фенилметил–сульфонилфторид–ингибируемой карбоксипептидазы в тканях крыс.
6. Изучить влияние однократного введения этанола на активность карбоксипептидазы М в тканях крыс.
7. Провести статистическую обработку результатов исследования.

Бакалаврская работа состоит из 3 глав, написана на 51 листах, имеет 3 таблицы и 10 рисунков, список литературы состоит из 89 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Этиология хронического потребления алкоголя

Из всех психоактивных веществ наиболее употребляемым во всем мире является алкоголь. Согласно данным ВОЗ алкоголизм сегодня является третьей серьезной проблемой здравоохранения после заболеваний сердца и онкологии. Если провести аналогию с другими заболеваниями психического характера, острый и хронический алкоголизм можно отнести к полиэтиологическим заболеваниям, которые сопряжены различными патогенетическими механизмами, в свою очередь, затрагивающие многие функциональные аспекты деятельности органов и систем организма человека.

Известно, что все теории, касающиеся этиологии хронического потребления алкоголя можно подразделить на три основные группы: биологические, социологические и психологические. Каждая из теорий дает свое объяснение возникновению и развитию данной патологии, но наиболее полный подход к проблеме имеет биологическая теория.

Многие исследователи поднимают вопрос о роли наследственности в появлении хронического алкоголизма как генетически обусловленного дефекта в энзиматических механизмах. Они отмечают, что хроническим алкоголизмом чаще болеют люди, родители которых злоупотребляют напитками, содержащими спирт и, кроме того, отмечено, что такое потомство имеет некоторые особенности метаболизма [87]. Таким образом, можно предположить, что злоупотребление напитками, содержащими этиловый спирт, создает у детей предпосылки к прогрессивному развитию патологического влечения к алкоголю.

Полагают, что патология хронического потребления алкоголя передается по наследству и может иметь рецессивный характер, при котором не последнюю роль играют факторы внешней среды, так как данное

патологическое состояние характерно и для людей с различной наследственностью, в том числе и неотягощенной. Это предположение подтверждают исследования, при которых не были обнаружены различия в частоте заболеваемости алкоголизмом детей, у которых один из родителей имел или не имел тягу к потреблению алкоголя, если эти дети воспитывались и жили вне семьи [65].

Приобретенные или генетически обусловленные изменения, затрагивающие систему обмена веществ в организме человека, могут служить предпосылкой прогрессирующего развития хронического алкоголизма [57]. В настоящий момент привести к этому доказательств не возможно, так как данные изменения, у страдающих алкоголизмом, могут быть следствием самого заболевания. Исследования на животных показали, что крысы, у которых был выявлен высокий уровень печеночной алкогольдегидрогеназы, охотнее воспринимали употребление этилового спирта по сравнению с животными контрольной группы [18]. При этом авторы указывают, что крысы–самцы имеют более низкий (в 2 раза) эндогенный уровень этанола, чем самки. Так после однократного введения этилового спирта, его концентрация в крови самцов крыс снижается непосредственно в периоды нарастания и стабилизации, а у кастрированных самцов роль мотиватора потребления этилового спирта играет тестостерон [76]. Таким образом, из данных исследований можно отметить следующее: половые особенности обмена веществ в организме играют немаловажную роль в развитии биологического механизма патологического влечения к алкоголю.

1.2 Алкогольная интоксикация

1.2.1 Острая алкогольная интоксикация

Острая алкогольная интоксикация является ответной реакцией организма на патологический процесс, которая вызывает при этом нарушения в работе систем, затрагивающих поведенческие эффекты. К последним относится активация локомоторной активности, гипотермия, нарушения локомоторной функции, кома, летальный исход [49–51]. По мере уменьшения потребления этанола у животных могут происходить следующие изменения в организме – нарушения моторики, в том числе, потеря координации движений, седация, включая снотворное действие этилового спирта [49, 52].

Исследование влияния однократного введения этанола в организм составляет основную задачу не только для фундаментальной науки, но и практической медицины. На сегодняшний день проблема алкогольного отравления является актуальной для современной медицины, так как отмечена высокая частота летальных исходов от острой алкогольной интоксикации. Самоотравление этанолом представляет собой «химическую травму», которая развивается вследствие попадания в организм этилового спирта токсической дозы [53].

На основе современных представлений и сведений, касающихся механизмов токсического воздействия этилового спирта на организм, можно выделить два типа эффектов: прямые и опосредованные [36, 54–58].

1. Прямые эффекты этанола на организм заключаются в возникновении конформационных нарушений молекул, связывании с неэтерифицированными жирными кислотами, а также с мембранотропным свойством.

Наиболее существенное значение имеет неспецифическое связывание этанола с плазматическими мембранами, а так же их рецепторными

элементами. При этом сам процесс взаимодействия может быть полярным и неполярным [59–62]. Прохождение этилового спирта через мембраны может происходить двумя способами: с помощью ионных каналов и путем растворения его в слое липидов. С помощью ионных каналов этанол поступает в клетку за счет разности градиентов концентрации. При втором способе, растворение этанола приводит к появлению текучести плазматических мембран [58, 63–65].

Конформационные изменения молекул, в частности белков, вызываемые этиловым спиртом, приводят к функциональным нарушениям их основных свойств [11, 27, 66].

2. Опосредованные эффекты проявляются множеством различных нарушений процессов метаболизма, которые имеют место при окислении этанола в организме. Результатом таких реакций служит образование ацетальдегида, токсическое действие которого также оказывает влияние на процессы метаболизма [58, 67–71].

1.2.2 Хроническая алкогольная интоксикация

Хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ) это один из самых распространённых внешних химических воздействий на организм. Длительное введение этилового спирта негативно сказывается на многие структурные элементы организма, органы и их системы [59, 76, 123].

Токсическое действие этилового спирта имеет несколько путей воздействия:

1. Отравление этанолом может приводить к нарушениям в работе нейромедиаторных систем головного мозга, что, в свою очередь, приводит к развитию синдрома зависимости;
2. Воздействие больших доз этанола вызывает обширное нарушение работы всех внутренних органов и тканей организма;

3. Возникновение генетической предрасположенности у потомства, вследствие присутствия ХАИ уродителей [23, 31, 40, 74, 76].

Прежде всего, ХАИ оказывает влияние на функции семи основных систем головного мозга: дофаминергическую, адренергическую, серотонинергическую, ГАМК – ергическую, холинергическую, глутаматергическую и опиоидную [59, 77, 78]. Воздействие этанола на эти системы приводит к изменению взаимосвязи между ними, так этанол способен влиять как на биологические мембраны, так и на пластический обмен, нейромедиаторные системы, функциональное состояние генома [32, 74, 82]. Влияние этилового спирта на нейромедиаторные системы организма представляется важным для исследований, так как, нарушения связанные с функциональным состоянием таких систем при длительном действии этилового спирта способствуют формированию различных видов отклонений поведения, в том числе связанных с развитием пристрастия к алкоголю [59, 98]. Кроме того, наблюдается зависимость структурных и функциональных нарушений нейромедиаторных систем головного мозга и механизмов толерантности к этиловому спирту [15, 27]. Таким образом, можно подчеркнуть, что нарушения в работе нейромедиаторных систем должны быть учтены в процессе лечения алкогольной интоксикации.

Исследования показывают, что ХАИ приводит к снижению уровней норадреналина, дофамина в среднем мозге и гипоталамусе, наряду с этим отмечается повышение содержания продуктов распада данных гормонов [18, 28, 30]. Известно, что существует зависимость уровня катехоламинов от частоты потребления этилового спирта: однократное потребление этанола способствует интенсивному выбросу катехоламинов, в том числе и дофамина, в среднем мозге и гипоталамусе, длительное потребление этанола вызывает дефицит катехоламинов, принимающий угрожающий характер. При этом развитие патологического состояния организма может определяться уровнем активности и других нейромедиаторных и нейромодуляторных механизмов. К ним можно отнести холецистокининовую

систему (ХЦС) [78, 98]. Так ХАИ (7–месячная) сопровождается увеличением содержания эндогенного октапептидного фрагмента ХЦС и числа ХЦС–рецепторов во фронтальной коре при снижении плотности ХЦС–рецепторов в гипоталамусе [78].

Кроме того, ХАИ имеет влияние на ГАМК – ергическую систему, вызывая снижение ее активности [25, 26, 34]. Установлено, что под воздействием ХАИ, субъединицы ГАМК – А рецептора подвергаются конформационным изменениям, вызывающим ослабление чувствительности ГАМК – А рецепторного комплекса к внутренним лигандам [39].

Имеются данные о возникновении дисфункции в работе серотонинергической системы при развитии патогенеза алкогольной интоксикации. Исследования доказывают, что при данной патологии происходит значительное снижение уровня серотонина в мозге [140]. Кроме того, изменения были отмечены и в содержании основного метаболита серотонина– 5–гидроксииндолуксусной кислоты – в моче и спинномозговойжидкости у пациентов. Интересно отметить, что при уменьшении секреции медиатора серотонина и замедлении процессов его синаптического выхода, происходит изменение содержания серотонина в головном мозге. Данные реакции могут быть следствием токсического действия этилового спирта на серотонинергические нейроны [38, 82], [83].

1.3 Сопутствующие поражения органов желудочно – кишечного тракта

Нарушения в работе внутренних органов под воздействием ХАИ занимают основное место в клиническом течении алкоголизма, прежде всего за счет появления осложнений пациентов и последующего летального исхода [25, 27, 43, 45, 47]. Среди поражений, оказывающих влияние на общую продолжительность жизни пациентов, страдающих от алкогольной интоксикации, патология печени занимает ведущее место [23, 24, 74, 48]. Печень осуществляет основные реакции метаболического цикла этанола,

который поступает в организм. Постоянное потребление этанола способствует перегрузке путей метаболизма и превращает печень в «орган – мишень». Известно, что патогенез алкогольной болезни печени (АБП) обусловлен в первую очередь процессами окислительного стресса, за счет генерации активных форм кислорода [74]. При АБП можно отметить накопление липидов, увеличение свободно радикального окисления, усиленно накопление продуктов перекисного окисления липидов(ПОЛ) и формирование некрозов печеночных клеток [8, 49].

Кроме того, алкогольная интоксикация может приводить к уменьшению содержания витаминов А, Е и глутатиона в клетках [33, 64, 74]. Дефицит витамина Е вызывает активизацию процессов ПОЛ, дефицит витамина А ведет к повреждению лизосом, а дефицит глутатиона способствует возникновению нарушений функций митохондрий, с последующей трансформацией клетки в сторону увеличения чувствительности к апоптозу [52,54]. Отмечено, что гибель гепатоцитов печени при алкогольной интоксикации является основным фактором вызывающим нарушение окислительного фосфорилирования за счет активации процессов ПОЛ. Данные процессы сопровождаются развитием энергетического дефицита, а также нарушением β -окисления жирных кислот и накоплением их в гепатоцитах [55].

Возникновение окислительного стресса, вследствие алкогольной интоксикации организма, способствует активизации свободно радикального окисления белков и их комплексов с липидами [56]. А также, ХАИ принимает участие в усилении катаболизма печеночных белков [33].

Печень не только является главной мишенью для этанола, но и выполняет ряд основных функций в поддержании гомеостаза всех классов органических соединений [72, 74]. Поэтому исследование нарушений в метаболических процессах организма, при действии этилового спирта на организм, позволит понять явления, происходящие как на клеточном, так и на тканевом уровнях.

Одним из результатов длительного воздействия на организм ХАИ (4 месяца) является гипогликемия [12]. Известно, что развитие данной патологии при длительном потреблении этилового спирта связано с появлением дисбаланса между образованием и утилизацией глюкозы. Такие изменения имеют прямую зависимость от воздействия этанола на отношение НАД/НАДН₂ в клетках печени. Как результат угнетение процессов глюконеогенеза и развитие гипогликемии [32].

Многие авторы выделяют несколько факторов, влияющих на токсическое действие этилового спирта при поражении других органов пищеварительной системы. Так при попадании этанола в ЖКТ начинают усиливаться процессы его пресистемного метаболизма, то есть разрушение его алкогольдегидрогеназой, вырабатываемой микрофлорой желудка, а также всасывание этанола и ацетальдегида в кровь. При этом, отмечается, что заболевания желудка (например, болезнь Мэллори– Вейса, синдром Рэндю – Ослера) способствуют снижению активности алкогольдегидрогеназы, что в свою очередь, способствует угнетению интенсивности пресистемного метаболизма этилового спирта. Кроме того, на снижение активности алкогольдегидрогеназы имеют влияние такие препараты как аспирин, парацетамол, Н-2-гистаминоблокаторы. Они снижают биотрансформацию этилового спирта и его токсидинамику, обусловленную ацетальдегидом.

ХАИ может вызвать дистрофические процессы не только в желудке, но и в тощей, тонкой кишке, такие как отек клеточных элементов, эксфолиацию, нарушение микроциркуляции, атрофию слизистых оболочек, образование язв. Наиболее подвержены патологическим нарушениям верхние отделы ЖКТ, так эрозивный гастрит является основной причиной кровотечений, возникающих у 20 % пациентов страдающих ХАИ [46]. Также этанол имеет существенное влияние на дистальную часть 12-перстной кишки и проксимальную часть тощей кишки. Это обусловлено тем, что в данных отделах равновесные концентрации этанола (в разделах кровь/ткань) удерживаются более длительно, по сравнению с другими отделами

кишечника. Многочисленные морфологические изменения слизистой оболочки могут сопровождаться нарушением пристеночного пищеварения, всасывания глюкозы, тиамина, фолиевой кислоты, цианкобаламина и, в частности, метионина. Вместе такие патологические процессы могут являться одним из основных факторов нарушения обмена веществ, а также прогрессирования осложнений алкогольной интоксикации. В данных отделах кишечника локализованы гипофиз–независимые нейроэндокринные клетки, которые секретируют в кровь вещества, выполняющие медиаторные функции.

Следует отметить, что при ХАИ наблюдается эрозия слизистой оболочки желудка и тонкого кишечника, что вместе с нарушениями свертывающих свойств крови может вызывать желудочно–кишечные кровотечения. Кроме того, этанол может проявлять панкреатоксическое действие, которое обусловлено приемом этилового спирта на фоне с лекарственными препаратами.

1.4 Сопутствующие поражения органов выделительной системы

Поражения ЖКТ могут протекать, как изолировано, так и в комплекс с воспалениями органов выделительной системы. Наиболее распространенное заболевание, вызываемое алкогольной интоксикацией, является энтероколит – воспаление тонкой и толстой кишки. Оказывая разрушающий эффект на процессы пищеварения и всасывания в кишечнике, энтероколит вносит существенные черты в клиническое течение патологии алкоголизма, а также способствует ухудшению питания пациента. ХАИ, воздействуя на кишечную флору, обуславливает развитие не только энтероколита, но и инфекционные заболевания других отделов систем пищеварения и выделения. Немаловажную роль в процессах развития патологии играет неполноценное питание, дефицит белка, витаминов В1 и А, что в комплексе приводит к нарушению регенерации слизистой оболочки. В частности энтероколит

способствует ожирению печени, инфекционным заболеваниям желчных путей, отекам и летальному исходу [15].

ХАИ оказывает влияние и на функциональное состояние почек. Они участвуют в регуляции водно-электролитного баланса, в поддержании кислотно-щелочного состояния, выделении азотистых соединений и др. Известно, что моча, из почки выводит 50–70 граммов химических веществ в сутки, которые состоят из более чем 150 органических (30–50 граммов) и неорганических (15–25 граммов) молекул. Таким образом, почки предотвращают процессы отравления ядами, попавшими извне, и веществами, образовавшимися в самом организме [23].

Способствуя прогрессированию воспалительного процесса в системе мочеотделения, алкогольная интоксикация, способствует развитию ряда хронических заболеваний почек, таких как почечнокаменная болезнь, нефрит, пиелит и др. Развитие таких заболеваний обусловлено тем, что этанол, всосавшийся в кровь, вызывает непосредственное целенаправленное токсическое влияние на ткани почек. Кроме того, почки могут быть подвергнуты поражению при ХАИ вторично, в случае развития атеросклероза сосудов почки, а также гепатита [47]. Существенную роль в патогенезе развития заболеваний почек при ХАИ играет сопряженность деятельности почек и печени.

Можно отметить, что небольшие дозы этилового спирта способствуют возникновению нарушений в процессе мочеотделения, то есть полиурии. Последняя связана с токсическим действием этанола на почечные ткани, вызывающим стойкое повышение фильтрационной способности почек. По – видимому, мочегонное действие этанола зависит и от содержания неалкогольных примесей. Этиловый спирт имеет влияние на антидиуретический гормон – основной фактор регуляции водного обмена [58, 64, 80]. В свою очередь, усиление диуреза, обуславливает задержку в организме натрия, хлора и азота, а также переход воды из клеток во внеклеточное пространство, тем самым способствуя развитию нарушений

водно – солевого баланса организма. При ХАИ прослеживаются жировые видоизменения тканей почек, а также увеличение последних. Кроме того, при патологических процессах, вызванных алкогольной интоксикацией, может быть выявлены следующие нарушения в работе выделительной системы: склероз почечных сосудов (до 20 % пациентов в возрасте 30–40 лет), кровоизлияния в почку, инфаркты почек, возникновение очагов отмирания тканей.

1.5 Ферменты обмена регуляторных пептидов

1.5.1 Карбоксипептидаза Е

Карбоксипептидаза Е впервые была выделена из хромаффинных гранул надпочечников быка. Это фермент, участвующий в образовании энкефалинов из веществ – предшественников. В ходе дальнейших исследований КПЕ был обнаружен в мозге гипофиза островков Лангерганса поджелудочной железы, а впоследствии выделен и очищен.

Фермент представляет собой одноцепочечный гликопротеин. В клетках он присутствует в двух формах:

1. Растворимая форма.
2. Связанная форма с мембранами. Одна форма экстрагируется из мембран при pH 5,6 1 М раствором NaCl, а вторая только при совместном воздействии 1 М NaCl и 1% Тритона X-100.

При этом активность КПЕ значительно выше в растворимой форме, чем в мембраносвязанной. С мембраной фермент связывается по средством C-концевой амфифильной последовательности, которая состоит из гидрофильных и гидрофобных аминокислот (21 остаток) [13]. Помимо последовательности аминокислот в КПЕ присутствует Ca^{2+} –связывающий участок. Согласно исследованиям ионы Ca^{2+} не имеют влияния на активность

фермента, но обуславливают способность к его стабилизации, агрегации и связыванию с мембранами [55].

Максимальная активность КПЕ наблюдается при рН 5,5–6,0, что соответствует рН внутри секреторных везикул.

КПЕ выполняет функцию отщепления остатков аминокислот – лизина аргинина с С–конца природных и синтетических пептидов. Установлено, что отщепление остатков аргинина происходит быстрее, по сравнению с остатками лизина. Однако скорость отщепления остатков лизина в несколько раз меньше, чем остатков гистидина. Остатки же ароматических аминокислот КПЕ не отщепляет [88].

Фермент присутствует в органах локализации основных пептидов или их предшественников. В аденогипофизе, надпочечниках и островках Лангерганса поджелудочной железы обнаружена наибольшая активность КПЕ, а в задней доле гипофиза, стриатуме, гипоталамусе, гиппокампе, коре больших полушарий, среднем мозге обнаружено снижение его активности. Наиболее низкая активность КПЕ отмечается в стволовой части головного мозга, спинном мозге, легких, сердце, желудочно–кишечном тракте, печени и почках. Известно, что фермент ассоциирован со структурными элементами комплекса Гольджи, эндоплазматического ретикулума и секреторными везикулами. По – видимому, такая локализация состоит в взаимосвязи стечением процессов, оказывающих влияние на предшественников биологически активных пептидов [22].

У крыс с дефектом в работе КПЕ наблюдаются нарушения обмена нейропептидов, а также в его химических свойствах, в проявлении субстратной специфичности, локализации в организме и др. Такие нарушения показывает участие КПЕ в метаболизме многих пептидов, например, энкефалинов, β –эндорфина, АКТГ, нейротензина, окситоцина, вазопрессина, меланоцит стимулирующего гормона, вещества Р и др.

Установлено, что КПЕ может вовлекаться в процессы агрессивности [52] и предрасположенности к потреблению этилового спирта [56], а также в

формирование физической зависимости от последнего. Такие реакции осуществляются вследствие ответа фермента на многие стрессирующие факторы и на введение *in vivo* стероидных гормонов. Кроме того, многие авторы отмечают различие в активности фермента в зависимости от пола.

1.5.2 ФМСФ–ингибируемая карбоксипептидаза

Фенилметил – сульфонилфторид ингибируемую карбоксипептидазу впервые выделили в 1995 г., за счет процессов подавления основной карбоксипептидазы, находящейся в растворимой фракции серого вещества головного мозга кошки, ФМСФ [41,47,49]. Максимальная активность ФМСФ–КП наблюдается при pH 6,0–6,5. На активность фермента могут повлиять следующие вещества: 50 мМ NaCl, NaBr, KJ, KCl.

Известно, что ФМСФ–КП выполняет функцию отщепления аргинина от лей–энкефалин–арг и дансил–фен–лей–арг, при этом происходит образование лей–энкефалин и дансил–фен–лей соответственно. При этом более глубокие реакции гидролиза с участием ФМСФ–КП не выявлены [1, 92].

Исследования, касающиеся ингибирования фермента ФМСФ, отмечают, что он является сериновой карбоксипептидазой, которые присутствуют у млекопитающих в двух формах: лизосомальная карбоксипептидаза L и карбоксипептидаза C. При этом показано отличие ФМСФ–ингибируемой карбоксипептидазы от карбоксипептидазы C как по молекулярной массе, так и специфичности к субстратам. Кроме того, обнаружено, что фермент имеет молекулярную массу сходную с таковой у лизосомальной карбоксипептидазы, а также сходный ингибиторный профиль и оптимум pH. Но есть и отличия между этими веществами, они проявляются в различной специфичности к субстратам и локализацией в тканях.

Распределение активности ФМСФ–ингибируемой КП в организме

прослеживается следующее: обнаружен фермент во всех отделах мозга и в большинстве тканей, исключение составляют только почки, там наблюдаются следы активности фермента. Максимальная активность ФМСФ–КП установлена в надпочечниках, в гипофизе, печени и селезенке активность снижается на 40%, 30 и 35% соответственно. Кроме того снижение активности фермента относительно надпочечников можно наблюдать и в семенниках –почти в 2,5 раза ниже. В отделах мозга отмечена корреляция активности фермента в зависимости от отделов. Так высокая активность, примерно в 2–3 раза, наблюдается в гипофизе, относительно других отделов мозга, а наибольшее снижение активности –в четверохолмии и гиппокампе [3, 18, 32].

Можно выделить, что ФМСФ–КП принимает непосредственное участие в формировании алкогольной интоксикации, которая развивается в ответ на экзогенные и эндогенные стрессирующие факторы. Кроме того, выявлены различия в активности ФМСФ–КП в зависимости от пола, причем у самок активность фермента во многих тканях выше, чем у самцов.

1.5.3 Карбоксипептидаза М

Карбоксипептидаза М представляет собой гликопротеин с молекулярной массой 62 кДа [3]. Он связан с плазматической мембраной за счет остатка гликозил–фосфатидилинозитола. Отделение КПМ от мембраны может осуществить удалением гидрофобного хвоста, за счет действия на него трипсина и фосфолипазы. Реакция может протекать только *invivo*, так как КПМ обнаруживается только в биологических жидкостях организма, в частности в моче и амниотической жидкости.

Фермент состоит из 439 аминокислотных остатков, которые на 41% идентичны с аминокислотными остатками КПЕ и на 15% с КПВ и КПА. Максимальная активность КПМ наблюдается при pH 7,0, ионы Co^{2+} повышают активность фермента в 1,5–2 раза, причём степень активации

возрастает при снижении рН. При этом, можно отметить, преобладание эстеразной активности фермента над протеазной.

Invitro КПМ выполняет функцию отщепления остатков основных аминокислот брадикинина, динорфина А, фактора роста эпидермиса [45, 78, 92]. Имеются и некоторые особенности данного процесса, так при отсутствии ионов Co^{2+} фермент преимущественно отщепляет аргинин, если Co^{2+} присутствует, то предпочтение отдается лизину.

Локализован фермент главным образом в плаценте, почках, эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, а также в периферической и центральной нервной системе.

Таким образом, при детальном исследовании строения, основных свойств и процессинга карбоксипептидазы Е, фенилметил–сульфонилфторид–ингибируемой карбоксипептидазы и карбоксипептидазы М, можно проследить возможность взаимосвязи данных ферментов с реакциями и процессами протекающими в организме, который подвержен воздействию алкогольной интоксикации.

1.6 Влияние этанола на активность ферментов обмена нейропептидов

Функционирование ферментных систем организма наиболее подвержены нарушениям под влиянием этилового спирта. Это обусловлено их участием в образовании и инактивации нейропептидов– высокоактивных веществ природных пептидов, которые играют основную роль в реализации многих физиологических и поведенческих реакции организма. Особо велико участие нейропептидов в формировании и развитии пищедобывательного поведения, в регуляции полового созревания, а также вовлечение в ответные реакции организма на интоксикацию [4, 9]. Они способствуют развитию толерантности и предпочтения к этанолу, что является интересным для

исследования зависимости активности ферментов их обмена при острой и хронической алкогольной интоксикации.

Известно, что при ХАИ происходят значительные изменения, затрагивающие метаболизм биологических веществ. Так в мозге крыс отмечено уменьшение уровня пептидов и нейтральной эндопептидазы, однако в сыворотке крови наблюдается обратный процесс. Так же отмечается повышение активности в крови катепсинов А и D [23,37].

Кроме того, можно отметить, что особый интерес вызывают данные о вовлечении КПЕ, КПМ и АПФ в реализацию стресс–протективного действия этанола [26, 40]. Так показано, что внутрибрюшинное введение крысам физиологического раствора, влияет на активность ферментов обмена нейропептидов, вызывая при этом стойкое ее повышение: КПЕ в гипофизе и стриатуме, АПФ в гипофизе и сыворотке крови, КПМ в сыворотке. По – видимому, это обусловлено тем, что данные ферменты принимают участие в обмене ряда нейропептидов, которые в свою очередь, под действием внутрибрюшинной инъекцией физиологического раствора, вызывают развитие функциональных изменений в пептидэргических системах. В частности такие изменения затрагивают ангиотензин–брадикининую систему, стресс–систему и опиоидэргическую [38].

Таким образом, при употреблении различных доз этанола можно наблюдать ряд биологических изменений, вызванных развитием патологического состояния в организме. Главная роль в адаптационных реакциях при таких состояниях отводится протеолитическим ферментам, так как они влияют на процессы усиления или угнетения синтеза регуляторных пептидов, участвующих в поддержании метаболизма.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1 Материал и условия проведения исследований

Исследования проводились на самцах белых беспородных крыс в возрасте 3–х месяцев массой 200–250 г. Всего в эксперименте участвовало 18 животных. Крыс содержали в условиях вивария, где они получали обычный рацион питания.

Для определения активности КПЕ, ФМСФ–КП и КПМ в работе использовали следующие группы животных:

1. Интактная группа (n=6)
2. Контрольная группа – внутрибрюшинное введение 0,9% NaCl.
3. Экспериментальная группа– внутрибрюшинное введение этанола в дозе 1 г/кг веса.

Раствор этилового спирта (5%) вводили внутрибрюшинно самцам крыс экспериментальной группы в объеме 0,2-0,25 мл в дозе 1 г/кг [31,37]. Контрольным животным вводили равный объем 0,9%-го раствора NaCl. Через 0,5 и 4 ч после однократной инъекции животных декапитировали под хлороформным наркозом.

Извлекали два отдела мозга: гипоталамус и стриатум, а также надпочечники и семенники. Ткани помещали в предварительно охлажденный физиологический раствор, очищали от кровеносных сосудов и оболочек, высушивали фильтровальной бумагой.

Затем ткани взвешивали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком. С прибавлением 10 мМ натрий–ацетатного буфера при pH 5,7, содержащим 50 мМ NaCl в соотношении 1:100 (вес:объем) для отделов мозга и надпочечников. Для семенников в соотношении 1:50.

2.1.1 Метод определения активности карбоксипептидазы E

Активность КПЕ определяли флуорометрическим методом Fricker и Snyder [81]. Активность КПЕ оценивали по скорости гидролиза дансил-фен-ала-арг при pH 5,7, чувствительному к торможению высокоспецифичным ингибитором этого фермента – гуанидиноэтилмеркаптоянтарной кислотой (ГЭМЯК). Опытные пробы содержали 50 мкл гомогената и 150 мкл 50 мМ натрий ацетатного буфера, содержащего 50 мМ NaCl. В контрольные пробы вносили ГЭМЯК в конечной концентрации 1 мкМ. Пробы преинкубировали 8 мин. при 37°C, затем вносили 50 мкл предварительно нагретого до 37°C раствора субстрата (концентрация в пробе 42 мкМ), приготовленного на том же буфере и инкубировали в течении 60 мин. при 37°C. Реакцию останавливали прибавлением 50 мкл 1 М раствора HCl. Для экстракции продукта реакции дансил-фен-ала-аргк пробам приливали по 1,5 мл. хлороформа, интенсивно встряхивали в течение 1 минуты. Хлороформную и водную фазы разделяли центрифугированием в течение 10 минут при 1000 об/мин.

Флюоресценцию хлороформной фазы измеряли на флюориметре при $\lambda_{ex}=360$ нм и $\lambda_{em}=530$ нм в кювете толщиной 1 см. В качестве стандарта использовали 2 мкМ раствор дансил-фен-ала в хлороформе.

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

2.1.2 Метод определения активности карбоксипептидазы М

Определение активности КПМ проводится по выше изложенной схеме, но в качестве буфера используется 200 мМ трис-НСl, рН 7,4 [80].

2.1.3 Метод определения активности ФМСФ–ингибируемой карбоксипептидазы

Активность ФМСФ–КП определяли флуорометрическим методом Fricker и Snyder[81]. Активность ФМСФ–КП оценивали по скорости гидролиза дансил–фен–лей–арг при рН 5,7, чувствительному к торможению ФМСФ. Опытные пробы содержали 50 мкл гомогената и 150 мкл 50 мМ натрий ацетатного буфера, содержащего 50 мМ NaCl. В контрольные пробы вносили ФМСФ в конечной концентрации 1 мМ. Пробы преинкубировали 8 мин. при 37°C, затем вносили 50 мкл предварительно нагретого до 37°C раствора субстрата (концентрация в пробе 42 мкМ), приготовленного на том же буфере и инкубировали в течении 60 мин. при 37°C. Реакцию останавливали прибавлением 50 мкл 1 М раствора HCl. Для экстракции продукта реакции дансил–фен–лей–аргк пробам приливали по 1,5 мл хлороформа, интенсивно встряхивали в течение 1 минуты. Хлороформную и водную фазы разделяли центрифугированием в течение 10 минут при 1000об/мин.

Флюоресценцию хлороформной фазы измеряли на флюориметре при $\lambda_{ex}=360$ нм и $\lambda_{em}=530$ нм в кювете толщиной 1 см. В качестве стандарта использовали 2мкМ раствор дансил–фен–лей в хлороформе.

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

2.2.4 Метод определения содержания белка

Концентрацию белка в сыворотке крови крыс определяли по Лоури [85].

2.2.5 Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую обработку полученных данных проводили с привлечением t -критерия Стьюдента [55].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Изучение активности карбоксипептидазы Е в тканях крыс

Изменение активности карбоксипептидазы Е в тканях intactных крыс представлено в таблице 1.

Таблица 1- Активность КПЕ в тканях intactных крыс ($M \pm m$, $n=6$)

Гипоталамус	Стриатум	Надпочечники	Семенники
0,231 $\pm$ 0,018	0,157 $\pm$ 0,014	0,072 $\pm$ 0,011	0,029 $\pm$ 0,009

Активность КПЕ у крыс меняется в зависимости от отдела мозга: наиболее высокие значения активности обнаружены в гипоталамусе, в стриатуме отмечается снижение активности примерно в 1,5 раза. В надпочечниках и семенниках активность КПЕ снижается по сравнению с таковой в гипоталамусе в 3 и 8 раз соответственно.

Исследовано влияние инъекции 0,9 % NaCl и однократного введения этилового спирта на активность КПЕ в тканях крыс в 2-х временных промежутках 0,5ч., 4ч. (Рис.1–4)

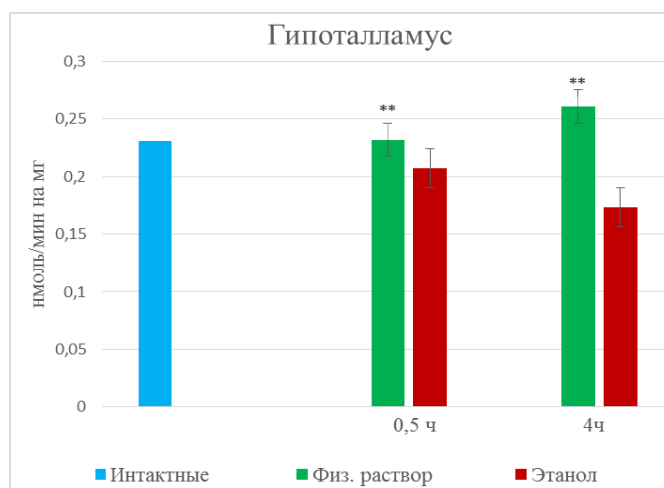


Рисунок 1. Активность КПЕ при введении 0,9 % NaCl и однократного введения этанола в дозе 1 г/кг в гипоталамусе самцов крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин. инкубации на 1 мг белка, $M \pm t$, $n=6$). Здесь: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ относительно интактных крыс

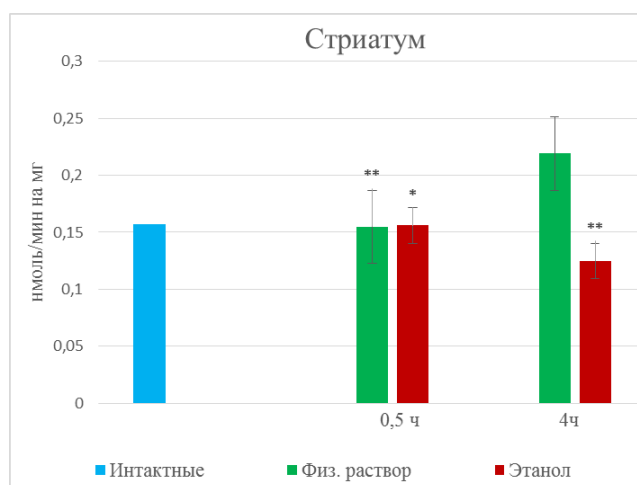


Рисунок 2. Активность КПЕ при введении 0,9 % NaCl и однократного введения этанола в дозе 1 г/кг в стриатуме самцов крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин. инкубации на 1 мг белка, $M \pm t$, $n=6$). Здесь: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ относительно интактных крыс

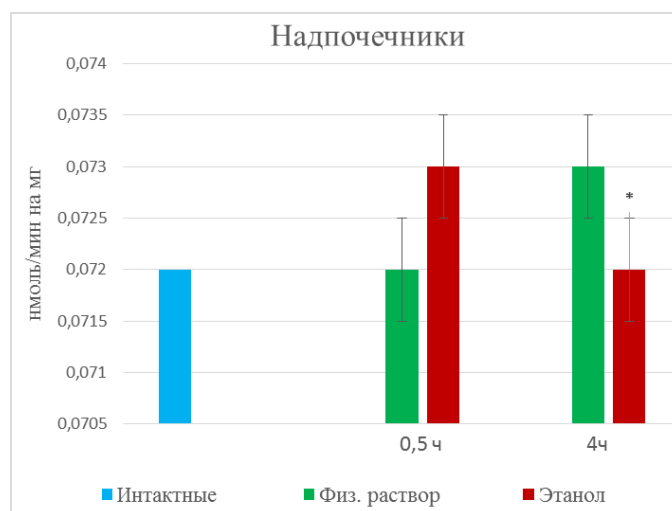


Рисунок 3. Активность КПЕ при введении 0,9 % NaCl и однократного введения этанола в дозе 1 г/кг в надпочечниках самцов крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин. инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=6$).

Здесь: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ относительно интактных крыс

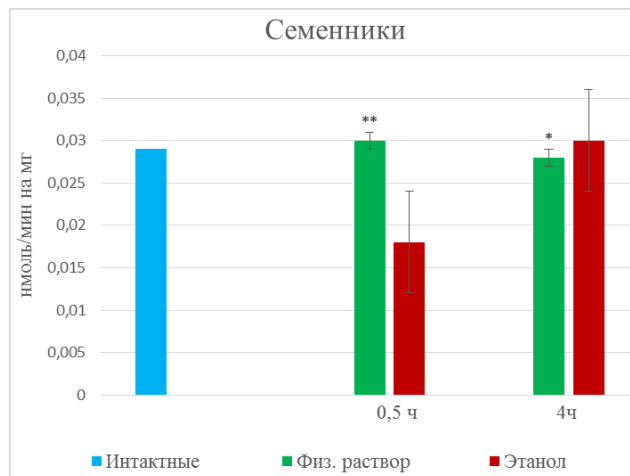


Рисунок 4. Активность КПЕ при введении 0,9 % NaCl и однократного введения этанола в дозе 1 г/кг в семенниках самцов крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин. инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=6$). Здесь: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ относительно интактных крыс

В результате проведенных исследований можно отметить, что через 4 часа после введения физиологического раствора в гипоталамусе происходило достоверное снижение активности КПЕ в 1,1 раза, а в стриатуме наблюдалось увеличение активности фермента в 1,4 раза по сравнению с контрольной группой животных. По – видимому, наблюдаемые изменения в активности КПЕ способствуют участию пептидэргической системы в реакциях адаптации организма к стрессу, вызванному инъекцией.

В надпочечниках и семенниках не выявлено влияния внутрибрюшинного введения физиологического раствора на активность КПЕ.

Однократная инъекция этилового спирта в гипоталамусе вызывала снижение активности КПЕ через 0,5 часов в 1,1 раза и через 4 часа в 1,33 раза относительно интактных крыс. Вероятно, такие изменения в активности КПЕ обусловлены увеличением уровня КРФ, β -эндорфина в ответ на прогрессирующие процессы алкогольной интоксикации [19, 86].

В стриатуме через 4 часа после введения этилового спирта активность фермента снижалась в 1,2 раза по сравнению с контрольной группой животных. По – видимому, изменения активности КПЕ в стриатуме связаны сформированием влечения к этанолу, за счет влечения уровня метэнкефалина, выполняющего функцию реализации эффекта эйфории.

Снижение активности КПЕ можно отметить в семенниках через 0,5 часа после инъекции этанола в 1,7 раза. Вероятно, снижение активности фермента может быть связано с воздействием этанола на уровень тестостерона в организме самцов. Однако действие однократной инъекции этилового спирта не достаточно для возникновения нарушений в обмене тестостерона и его уровень быстро приходит в норму [98].

Достоверного влияния однократного введения этанола на активность КПЕ в надпочечниках не выявлено.

Можно сделать вывод, что у крыс активность КПЕ изменяется под влиянием однократного введения этилового спирта. Вероятно этому

послужило изменение уровня гонадотропных гормонов, АКТГ и кортикостероидов, под воздействием инъекции как стрессирующего фактора [17].

3.2 Изучение активности ФМСФ–ингибируемой карбоксипептидазы в тканях крыс

Изменение активности ФМСФ–ингибируемой карбоксипептидазы в тканях intactных крыс представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Активность ФМСФ–КП в тканях intactных самцов ($M \pm m$, $n=6$)

Гипоталамус	Стриатум	Надпочечники	Семенники
0,200 $\pm$ 0,008	0,201 $\pm$ 0,007	1,148 $\pm$ 0,126	0,115 $\pm$ 0,021

При анализе полученных данных можно отметить, что наибольшая активность ФМСФ – КП наблюдается в надпочечниках. В стриатуме и гипоталамусе активность фермента значительно снижается, примерно в 6 раз по сравнению с таковой в надпочечниках.

Исследовано влияние инъекции 0,9 % NaCl и однократного введения этилового спирта на активность ФМСФ – КП в тканях самцов крыс в 2–х временных промежутках 0,5ч., 4ч. (Рис. 5–8)

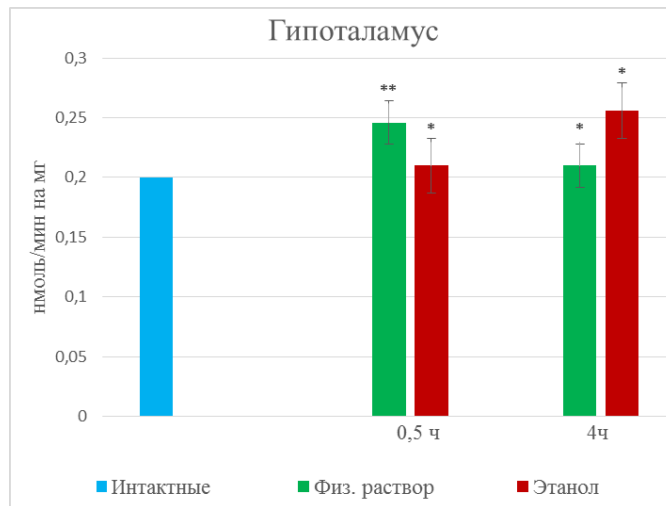


Рисунок 5. Активность ФМСФ – КП при введении 0,9 % NaCl и однократного введения этанола в дозе 1 г/кг в гипоталамусе самцов крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин. инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=6$). Здесь: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ относительно интактных крыс

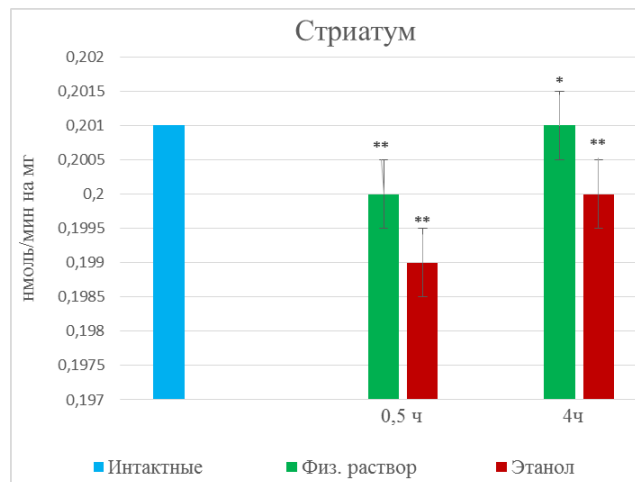


Рисунок 6. Активность ФМСФ – КП при введении 0,9 % NaCl и однократного введения этанола в дозе 1 г/кг в стриатуме самцов крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин. инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=6$). Здесь: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ относительно интактных крыс

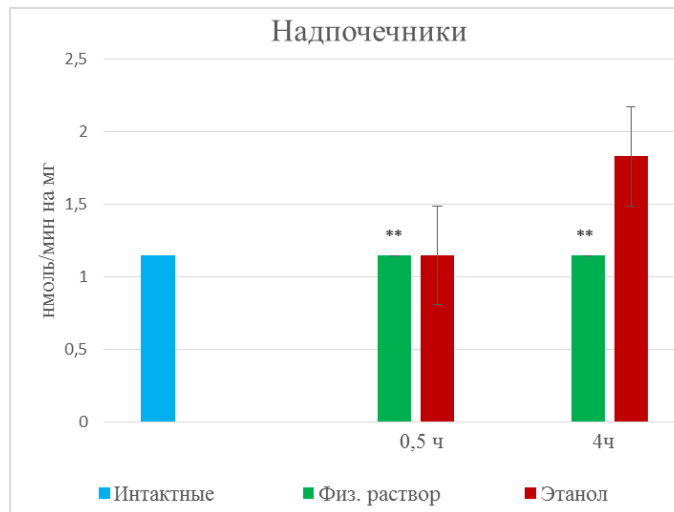


Рисунок 7. Активность ФМСФ – КП при введении 0,9 % NaClu однократного введения этанола в дозе 1 г/кг в надпочечниках самцов крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин. инкубации на 1 мг белка, $M \pm t$, $n=6$). Здесь: * $-p < 0,05$, ** $-p < 0,01$ относительно интактных крыс

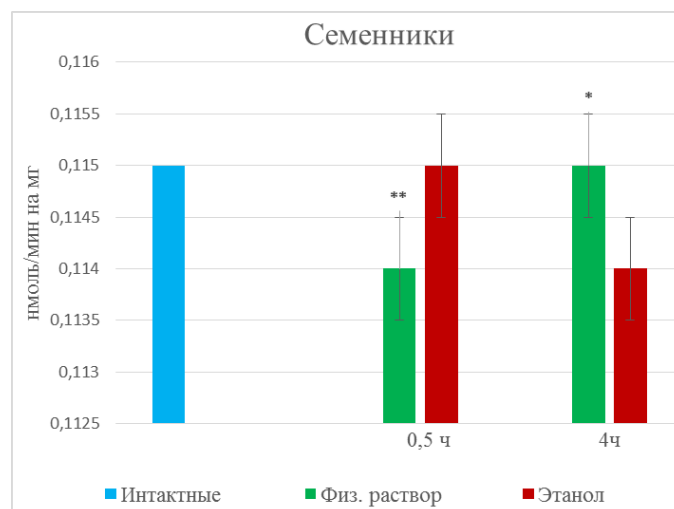


Рисунок 8. Активность ФМСФ – КП при введении 0,9 % NaClu однократного введения этанола в дозе 1 г/кг в семенниках самцов крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин. инкубации на 1 мг белка, $M \pm t$, $n=6$). Здесь: * $-p < 0,05$, ** $-p < 0,01$ относительно интактных крыс

Через 0,5 часа после инъекции физиологического раствора в гипоталамусе отмечено увеличение активности ФМСФ–КП в 1,23 раза по сравнению с таковой у интактных крыс. В стриатуме можно наблюдать снижение активности фермента в 1 раз относительно интактной группы животных. Однако внутрибрюшинное введение физиологического раствора в надпочечниках и семенниках не оказывало влияние на активность ФМСФ–КП. Активность ФМСФ–КП через 4 часа после введения физиологического раствора не изменялась ни в одном из исследуемых органов.

Через 0,5 часа после введения этанола, активность ФМСФ–КП не имела изменений ни в одном из изученных органов.

Под влиянием инъекции этилового спирта активность ФМСФ–КП повышалась в гипоталамусе только через 4 часа в 1,28 раза по сравнению с интактными животными. По – видимому, наблюдаемая корреляция активности фермента, связана с секрецией нейропептидов в гипоталамусе, которые принимают участие в поддержании оптимального уровня АКТГ.

Через 4 часа после введения этанола в надпочечниках происходило повышение активности ФМСФ–КП в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой самцов. Можно отметить отсутствие изменений в активности ФМСФ–КП в стриатуме и семенниках после инъекции этанола во всех исследуемых промежутках времени.

Таким образом, можно сделать вывод, что инъекция этилового спирта вызывала изменения активности ФМСФ–КП у животных, при чем характер изменений активности ФМСФ–КП зависел от исследуемых промежутков времени, а также органа, в котором проводилось изучение активности фермента.

3.3 Активность карбоксипептидазы М в тканях самцов крыс

Изменение активности КПМ в тканях интактных крыс представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Активность КПМ в тканях intactных крыс ($M \pm m$, $n=6$).

Гипоталамус	Стриатум
0,131 $\pm$ 0,011	0,069 $\pm$ 0,012

Исследовано влияние инъекции 0,9 % NaCl и однократного введения этилового спирта на активность КПМ в тканях самцов крыс в 2-х временных промежутках 0,5ч., 4ч. (Рис.9,10)

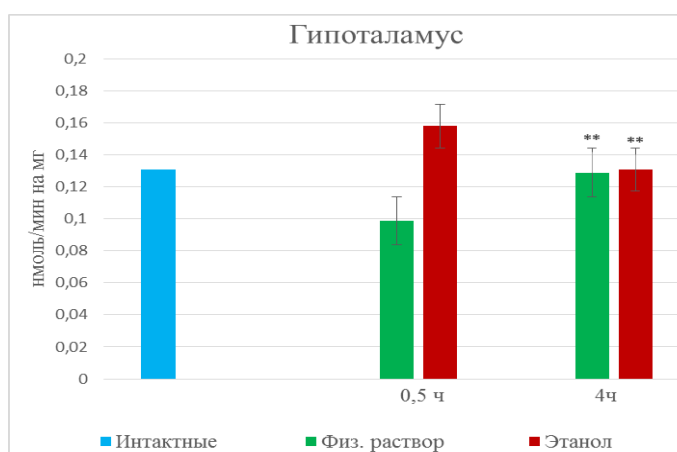


Рисунок 9. Активность КПМ при введении 0,9 % NaCl и однократного введения этанола в дозе 1 г/кг в гипоталамусе самцов крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин. инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=6$). Здесь: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ относительно intactных крыс

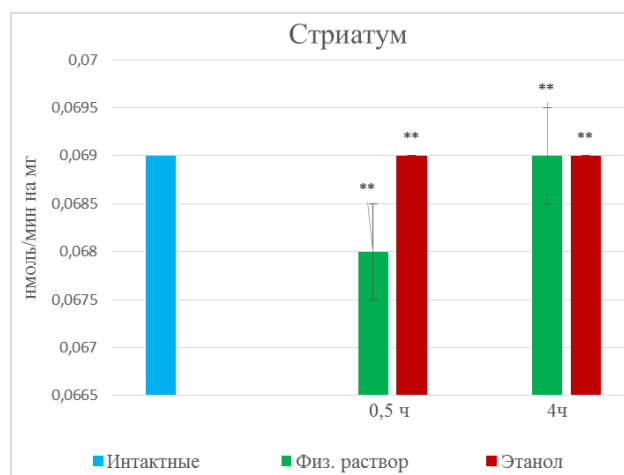


*Рисунок 10. Активность КПМ при введении 0,9 % NaCl и однократного введения этанола в дозе 1 г/кг в стриатуме самцов крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 мин. инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=6$). Здесь: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ относительно интактных крыс*

Внутрибрюшинное введение физиологического раствора оказывало влияние на активность КПМ только в гипоталамусе через 0,5 часа после инъекции. При этом наблюдалось снижение активности фермента в 1,32 раза по сравнению с интактными крысами.

Через 0,5 часа после инъекции этилового спирта активность КПМ в гипоталамусе увеличивалась в 1,2 раза, а в стриатуме изменений активности фермента по отношению к интактным животным не наблюдалось. Интересно отметить, что через 4 часа после инъекции этилового спирта активность фермента в гипоталамусе и стриатуме крыс изменениям не подвергалась. По – видимому, изменение активности фермента связано с увеличением уровня нейропептидов, обладающих действием эйфории, а также антистрессовым и анксиолитическим действием, в результате влияния алкогольной интоксикации на организм. Помимо этого, увеличение активности КПМ может принимать участие в процессах усиления распада эндозепина, большое количество которого может вызывать беспокойство и проконфликтное поведение.

Таким образом, можно сделать вывод, что наблюдаемые изменения активности КПМ у крыс, под воздействием инъекции этилового спирта, определялись органом, в котором проводилось изучение активности фермента и от исследуемых промежутков времени.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проблема алкоголизма и сопутствующей ему алкогольной интоксикации в настоящее время остается открытой и актуальной для общества, как в медицинском, так и в социальном аспекте. Поэтому явление алкогольной интоксикации представляет интерес для специалистов различных научных профилей. Экспериментальные исследования, к сожалению, не дают однозначного вывода об устойчивости к действию этанола организма человека. Тем не менее, алкогольная интоксикация имеет достаточно большое влияние на нейроэндокринную систему, а также на осуществление генеративных функций. При большом разнообразии исследований посвященных реакциям алкогольной интоксикации, патогенетические механизмы развития данного заболевания недостаточно изучены.

В работе было исследовано влияние внутрибрюшинного введения 0,9%-го раствора NaCl и этилового спирта на активность карбоксипептидазы Е, ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы и карбоксипептидазы М в гипоталамусе, стриатуме, надпочечниках и семенниках самцов крыс через два временных промежутка: 0,5 ч и 4 ч.

Внутрибрюшинное введение 0,9%-го раствора NaCl вызывало изменения значений активности исследуемых ферментов во всех органах крыс, что, по – видимому, является ответной реакцией организма на стрессирующий фактор, чем и является инъекция [21, 28, 82].

Особый интерес вызывает влияние этилового спирта на активность карбоксипептидазы Е, ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы и карбоксипептидазы М в разных органах крыс. Даже не значительные изменения активности данных ферментов дают определенные представления о процессах, которые происходят в пептидэргической системе при алкогольной интоксикации.

Так влияние активности карбоксипептидазы Е, ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы и карбоксипептидазы М на синтез и утилизацию

нейропептидов способствует лучшему пониманию не только роли ферментов в данных процессах, но и места регуляторных пептидов в патологии алкогольной интоксикации [14, 52].

ВЫВОДЫ

1. Внутривбрюшинное введение физиологического раствора вызывало достоверное увеличение активности карбоксипептидазы Е в гипоталамусе и стриатуме крыс.
2. Внутривбрюшинное введение физиологического раствора вызывало разнонаправленный характер изменений активности ФМСФ–ингибируемой карбоксипептидазы в гипоталамусе и стриатуме крыс.
3. Внутривбрюшинное введение физиологического раствора вызывало снижение активности карбоксипептидазы М, которое наблюдалось только в гипоталамусе крыс.
4. Внутривбрюшинное введение этилового спирта обуславливало снижение активности карбоксипептидазы Е во всех исследуемых органах крыс.
5. Внутривбрюшинное введение этилового спирта вызывало достоверное увеличение активности ФМСФ –ингибируемой карбоксипептидазы в гипоталамусе и надпочечниках крыс.
6. Внутривбрюшинное введение этилового спирта вызывало увеличение активности карбоксипептидазы М, которое наблюдалось преимущественно в гипоталамусе и надпочечниках крыс.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КПЕ–карбоксипептидаза E

КПМ–карбоксипептидаза M

ФМСФ–КП – фенилметил–сульфонилфторид–ингибируемая
карбоксипептидаза

ХАИ – хроническая алкогольная интоксикация

ГАМК – гамма – аминомасляная кислота

ХЦС–холецистокининовая система

АБП– алкогольная болезнь печени

ГЭМЯК–гуанидиноэтилмеркаптоянтарная кислота

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Азарян, А. В. Пептидгидролазы нервной системы и их биологические функции/ А. В. Азарян.– М.: Издательский центр «Ереван», 1989. –208 с.
2. Аккер, Л. В. Гормональные изменения и биологически активные вещества у женщин репродуктивного возраста, страдающих алкоголизмом /В. Я. Семке, Н. А. Бохан // Акушерство и гинекология.–1991.–№ 10.–С. 50-52.
3. Алиев, И. А. Нейрогормоны и алкоголизм / И. А. Алиев // Патол. физиология и эксп. терапия.–1989. – № 5. – С. 85-90.
4. Аминджанов, С. А. Содержание пептидов при хронической алкогольной интоксикации /Г. М. Барашкова // Клиническая медицина. –1987. – № 3.– С. 134-136.
5. Андропова, Л. М. Биологические механизмы и фармакотерапия экспериментального алкоголизма в зависимости от половых отличий: автореф.дис. ... канд.биол.наук/ Л. М. Андропова.– Москва,1989.–25 с.
6. Анищенко, Т. Г. К анализу факторов, детерминирующих половые различия в стрессовых реакциях у белых крыс /С. Н.Буршина, Л. Н.Шорина // Бюлл. эксперим. биол. медицины. – 1989. – № 11.– С. 616-618.
7. Арушанян, Э. Б. Зависимость переобучения крыс в У-образном лабиринте и их чувствительности к галоперидолу от фазы эстрального цикла /Г. К. Боровкова, С. В. Конеев, О. В. Терешкин // Журн. высш. нерв.деятельности им. И.П. Павлова. – 1988.–№ 6. – С. 1093-1097.
8. Афендикова, А. П. Влияние алкоголя на развитие эндокринных нарушений: обзор литературы / П. Н. Боднар // Врачебное дело. – 1987. – № 6.– С. 16-20.
9. Ашмарин, И. П. Нейропептиды в симпатической передаче / М. А. Каменская.– М.: Издательский центр «Москва», 1988.–184 с.
10. Бабич, Л. Г. Влияние этанола на внутриклеточный обмен Ca^{2+} /С. Г. Шлыков, Л. А. Борисова Л.А. // Укр. биохим. журн. –2002. –№ 1.–С.19-26.

11. Бабичев, В. Н. Нейро–гуморальная регуляция овариального цикла / 11. В. Н. Бабичев.–М.: Издательский центр «Медицина», 1984. –240 с.
12. Балбатун, О. А. Р50 и уровень эстрадиола в различные фазы эстрального цикла у крыс / Н. С. Слободская, Э. И. Троян // Материалы международной научной конференции, посвященной 35–летию Гродненского медицинского института. –1993.– № 5 –С.9-10.
13. Балыкова, Н. В. Влияние хронического эмоционально–болевого стресса на активность основных карбоксипептидаз в гипоталамо – гипофизарно–надпочечниковой системе пренатальнострессированных крыс / Е. С. Мухина // Вестник молодых ученых ПГПУ им. В.Г. Белинского. – 2003. – №2. – С. 8-10.
14. Беляев, Н. А. Активность энкефалинконвертазы в отделах мозга крыс при алкогольной интоксикации /М. Т. Генгин, С. В. Годына, В. Н. Калихевич, Л. Ф. Панченко // Вопр. мед.химии. –1988. –№ 4.–С. 118-122.
15. Беляев, Н. А. Динамика содержания мет–энкефалина в надпочечниках и плазме крови крыс при острой алкогольной интоксикации / Е. Ф. Колесанова // Вопросы мед.химии. –1990.–№ 3. – С.86-87.
16. Божко, Г. Х. Действие этанола на белки тканей и сыворотки крови человека и животных /П. В .Волошин // Усп. совр. биол. –1989.– № 1.– С. 52-65.
17. Боровая, Т. Г. Математическая модель физиологического эстрального цикла беспородных крыс /А. И. Назаренко, О. В. Волкова, Е. И. Адамская // Морфология. –1993.– № 12.– С. 114-125.
18. Боярский, К. Ю. Фолликулогенез и современная овариальная стимуляция (обзор литературы) /К. Ю. Боярский // Проблемы репродукции. – 2002. – № 3.– С. 36-43.
19. Буров, Ю. В. Нейрохимия и фармакология алкоголизма / К. М. Ведерникова.–М.: Издательский центр «Медицина», 1985. –240 с.
20. Бэйрд, Д. Т. Гормональная регуляция размножения у млекопитающих / Д. Т. Бэйрд.–М.: Издательский центр «Мир»,1987.–118–144 с.

21. Васильева, Ю. В. Независимость некоторых форм поведения самок крыс от фаз эстрального цикла /Т. М. Макарова // Журн. высш. нерв. деятельности им. П.И. Павлова. – 1994.–№ 2.– С. 368-369.
22. Балыкова, Н. В. Влияние хронического эмоционально–болевого стресса на активность основных карбоксипептидаз в гипоталамо – гипофизарно–надпочечниковой системе пренатальнострессированных крыс / Е. С. Мухина // Вестник молодых ученых ПГПУ им. В.Г. Белинского. –2003. – №2. С. 8-10.
23. Беляев, Н. А. Активность энкефалинконвертазы в отделах мозга крыс при алкогольной интоксикации / М. Т. Генгин, С. В. Годына, В. Н. Калихевич, Л. Ф. Панченко // Вопр. мед.химии. – 1988.–№ 4.–С. 118-122.
24. Беляев, Н. А. Динамика содержания мет–энкефалина в надпочечниках и плазме крови крыс при острой алкогольной интоксикации / Е. Ф. Колесанова // Вопросы мед.химии.–1990.–№ 3.–С.86-87.
25. Божко, Г. Х. Действие этанола на белки тканей и сыворотки крови человека и животных /П. В. Волошин // Усп. совр. биол. –1989.– № 4.– С. 52-65.
26. Ведерникова, Н. Н. Опиаты и эндогенные морфиноподобные пептиды: системный подход к оценке их роли в интеграции нервной и эндокринной регуляции в организме /А. И. Майский // Усп. совр. биол. – 1981. –№ 3.– С. 380-382.
27. Вернигора, А. Н. Активность основных карбоксипептидаз в тканях самок крыс на разных стадиях эстрального цикла / Ж. С. Бардинова, В. А. Сметанин, М. Т. Генгин // Укр. биохим. журн. – 2003.–№ 5. – С. 99-102
28. Вернигора, А. Н. Карбоксипептидаза Н мозга животных в норме и при действии стресс–факторов: автореф.дис. ... канд.биол.наук/А. Н. Вернигора.–Днепропетровск, 1991.–16 с.
29. Вернигора, А. Н. Влияние эмоционально–болевого стресса и этанола на карбоксипептидазо–Н–подобную активность в гипофизе и сыворотке крови крыс /М. Т. Генгин // Вопр. мед.химии. –1994.–№ 1.–С. 54-56.

30. Вернигора, А. Н. Влияние этанола на активность карбоксипептидазы Н в гипофизе и некоторых отделах головного мозга крыс при различных стрессирующих воздействиях /М. Т. Генгин // Физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 1993.–№ 3.– С. 34-38.
31. Вернигора, А. Н. Механизмы регуляции активности и биологическая роль карбоксипептидазы Н фермента процессинга нейропептидов / М. Т. Генгин// Биохимия. – 1995. – № 12. – С. 1491-1497.
32. Вернигора, А. Н. Основные отщепляющие остатки аргинина и лизина металлокарбоксипептидазы тканей млекопитающих: структура, свойства и функции/ М. Т. Генгин//Укр. биохим. журн. – 1998.– № 4. – С. 16-24.
33. Вернигора, А. Н. Протеолитические ферменты: субклеточная локализация, свойства и роль в обмене нейропептидов / М. Т. Генгин // Биохимия.– 1996. – № 5. – С. 771-785.
34. Вернигора, А. Н. Влияние стрессовых факторов на активность карбоксипептидазы Н в отделах головного мозга крыс /М. Т. Генгин, В. В. Макарова // Укр. биохим. журн. – 1992. – № 2. – С. 45-49.
35. Вернигора, А. Н. Влияние этанола, диазепама и резерпина на активность ангиотензин превращающего фермента и карбоксипептидазы Н в норме и при стрессе / М. Т.Генгин, Н. Н. Никишин // Вопр. мед.химии. – 1996. – № 2. – С. 127-130.
36. Вернигора, А. Н. Множественность молекулярных форм растворимых карбоксипептидазо-В-подобных ферментов головного мозга кошки / М. Т. Генгин, Н. Н. Никишин // Укр. биохим. журн. – 1993. – № 4.– С. 17-21.
37. Вернигора, А. Н. Об участии некоторых ферментов обмена нейропептидов в механизмах эмоционального стресса / М. Т. Генгин, Н. Н. Никишин // Физиол. журн. – 1995. – № 5.– С. 103-112.
38. Вернигора, А. Н. Очистка и физико-химические свойства растворимой карбоксипептидазы Н из серого вещества головного мозга кошки /М. Т. Генгин, Н. Н. Никишин // Биохимия. – 1992. – № 11. – С. 1712-1719.

39. Вернигора, А. Н. Распределение активности фенилметилсульфонилфторид–ингибируемой карбоксипептидазы в нервной ткани котов / М. Т. Генгин, Д. А. Салдаев, Н. В. Щетинина // Нейрохимия. – 1997.–№ 4. – С. 423-425.
40. Вернигора, А. Н. Влияние хронического потребления этанола на активность основных карбоксипептидаз в отделах мозга крыс /О. Е. Михайлова, М. Т. Генгин, Ю. А. Рыжкова, Е. С. Мухина // Укр. биохим. журн. – 2002.–№ 6.–С. 128-130.
41. Вернигора, А. Н. Влияние хронического потребления этанола на активность основных карбоксипептидаз в отделах мозга пренатальноалкоголизированных крыс /Е. С. Мухина, Н. В. Балыкова, М. Т. Генгин // Нейрохимия.– 2003.–№ 1.–С. 56-59.
42. Вернигора, А. Н. Влияние внутрибрюшинного введения физиологического раствора на поведение крыс в тесте “открытое поле” и активность ферментов обмена нейропептидов /Н. Н. Никишин, М. Т. Генгин // Физиол. журн.–1995.–№ 12.–С. 121-125.
43. Вернигора, А. Н. Влияние глюкокортикоидов на активность растворимой и мембраносвязанной форм карбоксипептидазы *in vivo* / Н. Н. Никишин, М. Т. Генгин // Укр. биохим. журн. – 1995.–№ 6.– С. 93-98.
44. Вернигора А. Н. Влияние этанола, диазепама и резерпина на активность ангиотензинпревращающего фермента и карбоксипептидазы *in vivo* / Н. Н. Никишин, М. Т. Генгин // Вопр. мед.химии. – 1996.– № 2.– С.127-130.
45. Вернигора, А. Н. Протеолитические ферменты и регуляция уровня активности нейропептидов /Н. Н. Никишин, М. Т. Генгин // Биохимия. – 1995.–№ 10.–С.1575-1579.
46. Вернигора, А. Н. Частичная характеристика основной фенилметилсульфонилфторид–ингибируемой карбоксипептидазы из головного мозга кошки /Н. Н. Никишин, М. Т. Генгин // Биохимия. – 1995.–№ 11.–С. 1860-1866.

47. Вернигора, А. Н. Влияние внутрибрюшинной инъекции оливкового масла на активность карбоксипептидазы Н и ФМСФ–ингибируемой карбоксипептидазы в гипоталамусе, гипофизе и надпочечниках мышей /Д. А. Салдаев, М. Т. Генгин // Нейрохимия.–2001. –№ 4.– С.290-294.
48. Вернигора, А. Н. Исследование активности основных (отщепляющих остатки аргинина и лизина) карбоксипептидаз у крыс разного возраста /Н. В. Щетинина, М. Т. Генгин // Биохимия.– 1996.–№ 10.–С. 1848-1856.
49. Виноградова, Е. П. Изменение уровня тревожности у самок белых крыс в течение эстрального цикла и в зависимости от хэндлинга /Е. В. Чаадаева // Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. –1994.–№ 2.–С. 277-282.
50. Вундер, П. А. О механизмах тормозного и стимулирующего влияния женского полового гормона на секрецию гонадотропинов /50.П. А. Вундер // Успехи современной биологии. – 1992.–№ 4.–С. 609-626.
51. Генгин, М. Т. Особенности структурно–функциональной организации и физико–химические свойства нелизосомальных пептидгидролаз мозга животных: автореф. дис. ... докт.биол.наук/ М. Т. Генгин.– Москва, 2002.– 28 с.
52. Генгин М. Т. Влияние эмоционально–болевого стресса на активность карбоксипептидазы Н – фермента процессинга нейропептидов головного мозга крыс /А.Н. Вернигора // Физиол. журн. – 1994. –№ 3.– С. 23-27.
53. Генгин, М. Т.. Влияние этанола на активность карбоксипептидазы Н в мозге крыс Н/ А. Н. Вернигора // Укр. биохим. журн.– 1993.–№ 1.–С. 100-103.
54. Генгин, М. Т. Ферменты процессинга опиоидных пептидов и методы определения их активности /А.Н. Вернигора // Укр. биохим. журн. –1994. –№ 2.– С. 3-17.
55. Лакин, Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин.–М.: Издательский центр«Высшая школа», 1990.–352 с.
56. Локшина, Л. А. Протеолитические ферменты в процессинге белков /В.С. Былинкина// Успехи совр. биол. –1990. –№ 2. – С. 219-237

57. Медведев, В. И. Проблема управления функциональным состоянием /А.В. Миролубов // Физиология человека.– 1984. – № 5. – С. 761-765.
58. Меерсон, Ф. З. Адаптация к стресс–ситуации и физиологической нагрузке / М. Г. Пшенников.– М.: Издательский центр«Медицина»,1988. – 25 с.
59. Машрина, И. П. Института биомед. химии РАМН / П. В. Стукалова. – М.: Издательский центр «Нейрохимия»,1996.–470 с.
60. Никитин, А. И. Нарушение формирования женских гамет и пренатальная патология /Э.МКитаев, Н.М Слозина, Е.Г. Неронова // Акушерство и гинекология. – 1990. – № 1.– С. 45-48.
61. Новиков, Г. В Алкоголизм и гипофизарно–надпочечниковая система / Г. В. Новиков.–М.: Издательский центр «Антидо», 2001.–290 с.
62. Оболенская, Н. Е. Некоторые особенности образования нейропептидов /Оболенская Н. Е.// Успехи совр. биол. – 1989. – № 3.– С. 337-341.
63. Панченко, Л. Ф. Исследование механизма действия этанола на активность энкефалиназы А мозга крыс /О.С Брусов, Н.А Беляев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1984. – № 6. – С.691-692.
64. Раевский, К. С. Эндогенные опиоидные пептиды как возможные нейротрансмиттеры / Раевский К.С // Итоги науки и техники ВИНТИ. Фармакол. химиотерапевт. средства.– 1982. – № 43. – С. 185-213.
65. Салдаев, Д. А. Активность основных карбоксипептидаз в тканях мышей при введении тестостерона и прогестерона 65.автореф. дис. канд. биол. наук / А. Д.Салдаев,– Москва, 2001.–24 с.
66. Салдаев, Д. А. Активность карбоксипептидазы Н в гипофизе и гипоталамусе самок мышей при введении тестостерона /А. Н. Вернигора // Физиология и биомедицина, клеточная биология. –1999.– № 13.– С.37-45
67. Шабанов, П. Д. Биология алкоголизма /С. Ю. Калишевич.– М.: Издательский центр «Москва», 1998.– 272 с.
68. Щетинина, Н. В. Активность основных карбоксипептидаз в тканях и отделах мозга крыс в онтогенезе: автореф. дис. канд. биол. наук / Н. В. Щетинина.–Москва, 1997./– 45 с.

69. Щетинина, Н. В. Активность основных карбоксипептидаз у крыс разного пола /А. Н. Вернигора, М.Т. Генгин// Укр. биохим. журн. – 1997. –№ 3.–С. 110-113.
70. Щетинина, Н. В. Тканевое и региональное распределение активности фенилметил сульфонилфторид–ингибируемой карбоксипептидазы и других карбоксипептидаз у крыс // Укр. биохим. журн. – 1997. – № 3.– С. 23-28.
71. Azaryan, A. V. Hook V.Y.H. Distinct properties of prohormonethiol protease compared to cathepsin B, cathepsin L, and cathepsin H – evidence for Ptpas a novel cysteine protease // Arch. Biochem. Biophys. – 1994. – V. 314,– № 1. – P. 171–177.
72. Brooks, A. N. Lamming G.E., Lees P.D., Haynes N.B. Opioid modulation of LH secretion in the ewe // J. Reprod. Fertil. – 1986. –V. 76, № 2 – P. 693–708.
73. Carter, A. Soliman M.R. Estradiol alters ethanol–induced effects on beta–endorphin and met–enkephalin levels in specific brain regions of ovariectomized rats // Pharmacology. – 1996. – V. 53, –№ 3.– P.143–150.
74. Chapin, R. E. Breese G.R., Mueller R.A. Possible mechanisms of reduction of plasma luteinizing hormone by ethanol // J. Pharmacol. Exp. Ther. –1980. – V. 212, –№ 1. –P. 6–10.
75. Charnning, C. P., Andersen L.D., Hoover D.J. Hormonal control of granulosa cell secretion of oocyte maturation inhibitor and inhibin–F activity // Follicular maturation and ovulation: Exp. Med. Intern. Congr. Amsterdam. – 1982. – P. 219–236.
76. Cheng, S. S. Tseng L.F. Chronic administration of ethanol on pituitary and hipotalamic β –endorphin in rats and golden hamsters // Pharmacol. Res. Commun. –1982.– V. 14,– № 10. –P. 1001–1008.
77. Davidson, H. W. Hutton J.C. The insulin–secretory–granule carboxypeptidase H. Purification and demonstration of involvement in proinsulin processing // J. Biochem.– 1987. –V. 245,– № 2. – P. 575–582.

78. Deddish, P. A. Skidgel R. A., Kriho V.B., Li X.Y., Becker R.P., Erdos E.G. Carboxypeptidase M in Madin–Darby canine kidney cells. Evidence that carboxypeptidase M has a phosphatidylinositol glycan anchor // J. Biol. Chem. –1990. –V. 265, –№ 25.– P. 15083–15089.
79. Fiedorek, F. T.Jr. Parkinson D. Carboxypeptidase H processing and secretion in rat clonal beta–cell lines // Endocrinology. –1992. – V. 131,– № 3.– P. 1054–1062.
80. Figueroa, C. D. Chacon C., Corthorn J., Ehrenfeld P., Muller–Esterl W., Valdes G. Temporospacial changes of kinin b2 receptors during the estrous cycle and pregnancy in the rat uterus // Pharmacol. Res. Commun. – 1986. – 18, № 1. –P. 49–60.
81. Kenney, W. C. Formation of Schiff base adduct between acetaldehyde and rat liver microsomal phosphatidylethanolamine. // Alcohol. Clin. Exp. Res. –1984. – V. 8,– № 6.– P. 551–555.
82. Khanna, A. S. Waisman D.M. Metabolism and intracellular processing of protein hormones // Hormon. Act. – 1988.– № 1. – P. 117–132.
83. Klein, R. S. Fricker, L.D. Differential effects of a phorbol ester on carboxypeptidase E in cultured astrocytes and AtT–20 cells, a neuroendocrine cell line // J. Neurochem. – 1993. – V. 60, – № 5.– P. 1615–1625.
84. Lowry, O. H. Protein measurement with the Folin phenol reagent. / O.H. Lowry, N.J. Rosebrought, A.G. Farr, R.J. Randall. // J. Biol. Chem. – 1951. – Vol. –193. – Iss. 1. – P. 265–275.
85. Lynch, D. R. Braas K.M., Hutton J.C., Snyder S.H. Carboxypeptidase E: immunocytochemical localization in the rat central nervous system and pituitary gland // J. Neurosci.– 1990. – V. 10,– № 5. – P. 1592–1599.
86. Simpson, K. B. May D. Some effects of the oestriccicly in the female rats // J.of the Institute of Animal Technicians. –1973. – № 24. – P. 25.
87. Skidgel, R. A. Davis R.M., Tan F. Human carboxypeptidase M. Purification and characterization of a membrane–bound carboxypeptidase that cleaves peptide hormones // J. Biol. Chem. – 1989.– V. 264, – № 4. – P. 2236–2241.

88. Skidgel, R. A. Erdos E.G. Cellular carboxypeptidases // Immunol. Rev. – 1998. –V. 161,– № 2.– P. 129–141.
89. Winkler, A. Buzas B., Siems W.E., Heder G., Cox B.M. Effect of ethanol drinking on the gene expression of opioid receptors, enkephalinase, and angiotensin–converting enzyme in two inbred mice strains // Alcohol Clin. Exp. Res. – 1998. – V. 22, –№ 6. –P. 1262–1271.

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.03.01 Биология
Профиль подготовки «Биохимия»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
Карпова Г.А. Карпова

«23» » 01 2018 г.

Задание

По ВКР студента Измаиловой Гулии Хайдаровны

Тема работы: «Влияние хронического употребления алкоголя на активность ферментов
обмена регуляторных пептидов»

Утверждена приказом по Университету от « 04 » 04 2018 г. № 2766

Срок сдачи студентом законченной работы « 25 » мая 2018 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1.	Собеседование с научным руководителем, обсуждение темы и структуры ВКР, формулировка цели, задач	январь 2018	выполнено
2.	Поиск научной, справочной литературы по теме ВКР, анализ современных научных достижений в области исследования по теме ВКР	январь 2018	выполнено
3.	Составление библиографического списка изученной литературы	январь 2018	выполнено
4.	Поиск и изучение методов исследования в рамках ВКР	февраль - март 2018	выполнено
5.	Подготовка главы «Обзор литературы»	февраль - март 2018	выполнено
6.	Подготовка главы «Материалы и методы исследования»	февраль – март 2018	выполнено
7.	Составление плана проведения эксперимента, подготовка к выполнению эксперимента	март - апрель 2018	выполнено
8.	Проведения исследований метода определения активности карбоксипептидазы Е, ФМСФ–ингибируемой карбоксипептидазы, карбоксипептидазы М, содержания белка.	март-апрель 2018	выполнено
9.	Исследование активности карбоксипептидазы Е в тканях крыс, ФМСФ–ингибируемой карбоксипептидазы в тканях крыс, карбоксипептидазы М в тканях крыс	февраль-май 2018	выполнено
10.	Обработка и анализ полученных результатов эксперимента. Собеседование с научным руководителем	февраль-май 2018	выполнено
11.	Оформление результатов исследования в виде таблиц, диаграмм, графиков	февраль-май 2018	выполнено
12.	Подготовка главы «Результаты исследования и их обсуждение»	май 2018	выполнено
13.	Итоговое оформление ВКР	май 2018	выполнено
14.	Подготовка презентации на защиту ВКР, подготовка к защите ВКР	июнь 2018	выполнено

Дата выдачи задания «23» 01 2018г.



Руководитель
Гамзин С.С.,
к.б.н., доцент кафедры
«Общая биология и биохимия»

Задание принял к исполнению
Измаилова Г.Х.

