МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ 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
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
на тему:

«ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА РЕГУЛЯТОРНЫХ ПЕПТИДОВ В КРОВИ СПОРТСМЕНОВ ЦИКЛИЧЕСКИХ ВИДОВ СПОРТА В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОГО ТЕСТИРОВАНИЯ»

Студент _____ Бердиев Ихтиёрджон Бахтиёрович

Руководитель _____ Соловьев В.Б.

Нормоконтролер _____ Кручинина А.Д.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 15.06.19 № 16)

Заведующий кафедрой _____ Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой хорошо
(протокол заседания ГЭК от 25.06.19 № 3)

Секретарь ГЭК _____ Клыченков С.В.

Пенза, 2019

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 6
1.1 Ферменты обмена регуляторных пептидов 6
1.2 Общая характеристика регуляторных пептидов и особенности их функций 8
1.2.1 Карбоксипептидаза N 8
1.2.2 Пептидилдипептидаза А 11
1.2.3 Лейцинаминопептидаза 14
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 15
2.1 Материал и условия проведения исследований 15
2.2.1 Общая схема исследования 15
2.2.2 Методы моделирования физической работы 15
2.2.4 Методы определения активности протеолитических ферментов 16
2.2.5 Определение концентрации регуляторных пептидов 19
2.2.6 Методы статистической обработки 19
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ 20
3.1 Влияние физической работы на уровень регуляторных пептидов в крови спортсменов и людей, не занимающихся спортом 20
3.1.1 Роль белковых гормонов, ростовых факторов, регуляторных пептидов и ферментов их обмена в регуляции метаболизма при физической работе 21
3.1.2 Активность пептидил-дипептидазы А, лизин-карбоксипептидазы и лейциламинопептидазы 27
ЗАКЛЮЧЕНИЕ 31
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 32

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. В последнее время в биохимии спорта большое внимание уделяется поиску ключевых факторов регуляции метаболизма, воздействие на которые значительно улучшит спортивный результат. Пептидергическая система служит наиболее перспективной мишенью для воздействия. В процессах адаптации нейропептиды представляют немаловажную значимость, осуществляют контроль за состоянием иммунной системы, принимают участие в формировании пищедобывательного и полового поведения [2]. Многие из этих веществ играют важную роль в регулировании полового созревания, оказывают влияние на половую дифференциацию организма, на эмоциональное поведение, на процессы памяти и внимания, обладают обезболивающим действием. Исследования последних нескольких лет свидетельствуют об участии некоторых регуляторных пептидов в реакциях адаптации при физической работе. Ограничения, которые связаны с трудностью введения регуляторных пептидов в организм животных, уменьшают вероятность их применения для регуляции функционального состояния организма и улучшения спортивного результата. Исследование уровня того или иного нейропептида в тканях и сыворотке крови не дает конкретных представлений о динамических процессах, которые происходят в пептидергической системе при физической работе. Для того, чтобы получить как можно больше информации необходимо изучить процессы синтеза и трансформации нейропептидов, так как концентрация биологически активных пептидов зависит от активности ферментов, которые принимают участие в их обмене.

Еще один недостаток существующих работ по исследованию содержания регуляторных пептидов при физической работе – отсутствие дифференциации объектов исследования по степени тренированности. Незначительное число людей могут продемонстрировать высокий

спортивный результат. К этим людям относятся спортсмены высокой квалификации, а обычные, неподготовленные на уровне спортсменов люди, повторить данный результат не в состоянии. Биохимические изменения, сопровождающие спортивный результат, весьма значительны и превосходят изменения, наблюдающиеся у обычных людей, которые не занимаются спортом, как количественно, так и качественно.

Знание путей образования и инактивации регуляторных пептидов, которые участвуют в ответе организма на физическую нагрузку, позволит, избирательно воздействуя на ферменты их метаболизма, регулировать уровень биологических форм тех нейропептидов, от которых зависит спортивный результат [42].

Впервые исследована активность ферментов при физической работе. Получив эти данные, можно приступать к разработке методов направленного влияния на активность ферментов обмена пептидов, которые участвуют в адаптации к физической работе, с целью улучшения спортивного результата.

Целью данной работы является выяснение роли пептидергической системы в адаптации к физической работе у спортсменов высокой квалификации.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие задачи:

- изучение уровня регуляторных пептидов в сыворотке крови здоровых людей и спортсменов высокой квалификации в состоянии покоя;
- исследование активности ферментов обмена регуляторных пептидов (ПДА, ЛКП, ЛАП) в сыворотке крови здоровых людей и спортсменов высокой квалификации в состоянии покоя;
- изучение уровня регуляторных пептидов в сыворотке крови здоровых людей и спортсменов высокой квалификации при физической работе.

Выпускная квалификационная работа написана на 41 листах, содержит 7 рисунков, 1 таблицу и список литературы на русском и английском языках из 78 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Ферменты обмена регуляторных пептидов

Регуляторные пептиды – обширная группа биологически активных веществ, которые оказывают влияние практически на все физиологические процессы, протекающие в живом организме. Данное понятие объединяет несколько групп соединений, которые отличаются между собой по структуре, функциям и локализации, поэтому установление единой классификации пептидов затруднено. Регуляторные пептиды играют решающую роль в передаче информации внутри клеток и тканей, между тканями и органами в организме или между различными организмами. Они производятся всеми биологическими видами, принадлежащими к разным типам, от бактерий до млекопитающих. Регуляторные пептиды оказывают широкий спектр биологического влияния, действуя, в частности, как нейромедиаторы, нейромодуляторы, гормоны, факторы роста, цитокины и др. Регуляторные пептиды представляют собой сравнительно короткие цепи из аминокислотных остатков. Под действием ферментов протеолиза эти молекулы образуются в организме из более крупных молекул-предшественников [24].

Всем многоклеточным организмам необходимы регуляторные системы для управления множеством функций клеток и которые объединяли бы их в единое целое в пределах организма. В первой половине 20-го века считалось, что существует три таких системы: нервная, иммунная и эндокринная. Данные системы работают самостоятельно и поэтому явления их взаимодействия являются исключением из правил. Но к 60-м годам двадцатого века появилось достаточно доказательств того, что на самом деле эти системы едины. Также было обнаружено звено, соединяющее все три системы в единую – биологически активные пептиды. До этого времени

исследования в области нейрохимии пептидов и пептидигидролаз были частичными.

Благодаря работам Хьюиса с 70-х годов произошёл существенный прогресс в изучении регуляторных пептидов и ферментов их обмена. В его работах были описаны вещества пептидной природы, которые обладали широким спектром физиологической активности. Также были собраны данные по их распределению и локализации с ферментами их обмена. Успешными были и попытки получить регуляторные пептиды и ферменты в очищенном виде.

Отдельного внимания заслуживает вопрос справедливости использования общепринятых терминов «регуляторные пептиды» и «нейропептиды». Эти и другие наименования на разных этапах изучения получили широкое распространение. В 1969 году все используемые термины были вытеснены понятием «нейропептиды» по предложению Де Вида, так как данное понятие отражало нацеленность предмета исследований и было информационно емким. Но вскоре этот термин подвергся критике, в связи с тем, что большое количество регуляторных пептидов широко экспрессируется и оказывает физиологическое действие и за пределами нервной системы. Было предложено более широкое понятие, которое наиболее полно отражало семантическую значимость термина – «регуляторные пептиды». На сегодняшний день охарактеризован синтез практически всех известных биологически активных пептидов для нервной системы, что дает основания пользоваться термином «нейропептиды» в более широком содержательном аспекте [8].

Сегодня изучены физико-химические свойства пептидов, специфичность их действия, разработан ряд синтетических аналогов физиологически активных пептидов, осуществлён химический синтез регуляторных пептидов, доказано их терапевтическое воздействие.

1.2 Общая характеристика регуляторных пептидов и особенности их функций

Биологически активные пептиды были обнаружены у различных биологических видов – от кишечнополостных до человека. Единая классификация регуляторных пептидов отсутствует, но несмотря на это для всех этих молекул характерны следующие свойства: относительно короткая химическая структура, которая включает в себя от 5 до 52 аминокислотных остатков, широкий спектр физиологического действия, образование в результате многоступенчатого гидролиза пептидов-предшественников.

Несмотря на отсутствие строгих закономерностей в строении и выраженную полифункциональность действия, известные классификации регуляторных пептидов в основном основаны на структурно-функциональном подходе. Можно выделить следующие группы пептидов в соответствии с описанными принципами:

- опиоидные пептиды;
- пептиды мозга и кишечника;
- пептиды нервной системы;
- пептидные гормоны;
- вазоактивные пептиды;
- тахикинины;
- иммуномодулирующие пептиды.

Функция большинства регуляторных пептидов реализована с участием ЦНС, как показывает сравнительный анализ.

1.2.1 Карбоксипептидаза N

Карбоксипептидаза N (КПN, энкефалинконвертаза, карбоксипептидаза Е, КФ 3.4.17.10) выделена и охарактеризована из мозга, гипофиза, хромаффинных гранул надпочечников, эндокринных клеток поджелудочной

железы. КПN во всех органах и тканях представлена несколькими формами: растворимой и мембраносвязанной. Обе эти формы являются гликопротеинами, имеют идентичную субстратную специфичность и чувствительность к групп-специфичным реагентам. Молекулярная масса растворимой формы составляет 53-57 кДа, мембраносвязанной формы – 55-57 кДа [45, 52].

Карбоксипептидаза N является тиолзависимым металлоферментом, в активном центре которого находится Zn^{2+} [54]. Фермент имеет оптимум pH 5,5-6,0, активируется ионами Co^{2+} в 5-10 раз, ионами Ni^{2+} в 2-3 раза, ингибируется $CuCl_2$, $HgCl_2$, аминопропилмеркаптоянтарной кислотой, 2-меркаптометил-3-гуанидилэтилтиопропановой кислотой, ЭДТА и 1,10-фенантролином. На активность КПN сульфат цинка, хлорид кальция, N-этилмалеимид и ФМСФ не влияют [78]. Наиболее эффективными ингибиторами являются ГЭМЯК и гуанидинопропилянтарная кислота с K_i 8,8 нМ и 7,5 нМ, соответственно. КПN ингибируется Met- и Leu-энкефалинами, веществом Р, вазопрессином, окситоцином, тиреотропин-рилизинг-фактором [59].

Уровни мРНК КПN и активности КПN в мозге и тканях в целом коррелируют между собой. Наивысшие уровни мРНК КПN обнаружены в пирамидальных клетках гиппокампа, супраоптическом и паравентрикулярном ядрах, эпендимных клетках боковых желудочков мозга, в передней и промежуточной долях гипофиза, базолатеральной миндалине [64]. Средние уровни мРНК КПN обнаружены в таламусе, коре мозжечка и промежуточной оливе, медиальном коленчатом ядре. Наименьшие уровни выявлены в латеральном гипоталамусе, гранулярном клеточном слое гиппокампа, бледном шаре и в ретикулярной формации ножки мозга [4].

В клетке КПN локализована, в основном, в секреторных гранулах, причем часто совместно с биологически активными пептидами – инсулином

[45], вазопрессином [71], энкефалинами [58], веществом Р [44], окситоцином [70], атриальным натрийуретическим фактором [67].

КПN обладает, практически, абсолютной специфичностью по отношению к пептидным субстратам с С-концевыми остатками основных аминокислот. Она хорошо отщепляет остатки аргинина и лизина от Arg^8-вазопрессин-Gly-Lys-Arg [71], а также превращает ^{125}I-Met-энкефалин-Arg^6 и ^{125}I-Met-энкефалин-Lys^6 в ^{125}I-Met-энкефалин. Фермент отщепляет остатки -Lys^{15}-Lys^{16}-Arg^{17} с карбоксильного конца фрагмента АКТГ ($АКТГ_{1-14}$) и остатки аргинина с С-конца гиппурил-L-Arg и Leu-энкефалин-Arg [58]. КПN с очень низким сродством отщепляет остаток гистидина с карбоксильного конца прокситоцина [76].

В ответ на внешние воздействия уровень мРНК КПN способен быстро изменяться. Они вызывают изменения уровня биологически активных пептидов или уровня их мРНК. В случае синтеза дефектной (неактивной КПN) (мутация в гене, кодирующем КПN) наблюдается нарушение синтеза и секреции многих биологически активных пептидов.

Физико-химические свойства, тканевая, клеточная и субклеточная локализация, субстратная специфичность, особенности изменения активности фермента при различных фармакологических воздействиях на организм и культуры клеток [13], нарушение синтеза нейропептидов у мышей с дефектной КПN свидетельствуют о том, что исследуемый фермент вовлекается в процессинг многих биологически активных пептидов, таких как энкефалины, нейротензин, АКТГ, вазопрессин, β-эндорфин, окситоцин, меланоцитстимулирующий гормон, вещество Р и др. [6], а также участвует в алкоголизме, стрессе, болезни Альцгеймера, в общем, в адаптационных процессах [31, 38].

1.2.2 Пептидилдипептидаза А

Ангиотензинпревращающий фермент (АПФ, дипептидил-карбоксипептидаза А, кининаза II, карбоксикатепсин, пептидилдипептидаза А, КФ 3.4.15.1) обладает пептидилдипептидазной и слабыми трипептидилкарбоксипептидазной и эндопептидазной активностями [50]. Фермент очищен и выделен из разных тканей различных видов животных [46]. Фермент из всех тканей (эндотелиальная форма), за исключением семенников (тестикулярная форма), имеет очень близкие иммунологические и физико-химические свойства. Фермент из семенников отличается от ангиотензинпревращающего фермента из других источников по иммунологическим свойствам и молекулярной массе

В мозге обнаружена лишь эндотелиальная форма. Эта форма состоит из одной полипептидной цепи, имеет молекулярную массу 170-180 кДа и включает в себя остатки нейтральных сахаров, около 13%. Данная форма состоит из двух гомологичных доменов, каждый из которых имеет активный центр и центр связывания Zn^{2+} [10].

Разница в степени гликозилирования образует две иммунологически идентичные формы, одна из них (эндотелиальная) с молекулярной массой 180 кДа присутствует (исключая семенники) во всех тканях, также и в мозге, а вторая (нейрональная) с молекулярной массой 170 кДа находится только в мозге, и не наличествует в других тканях [41].

Иногда обнаруживают в различных органах и тканях более высокомолекулярные каталитически активные формы АПФ с молекулярной массой 600 кДа, 430 кДа, 330 кДа, 240 кДа, иммунологически идентичные эндотелиальной форме. До сих пор неясно, являются ли эти формы предшественниками АПФ, или они образуются при гель-фильтрации благодаря возможности молекул фермента, как и других мембраносвязанных белков, к агрегации. pI фермента из различных органов и тканей колеблется в пределах от 4,6 до 5,1, это обусловливает гетерогенность фермента при

электрофоретическом разделении. Считается, что гетерогенность АПФ имеет важное значение для избирательности регуляции его активизации в различных тканях [25].

АПФ из различных источников имеет оптимум pH 7,6-8,2, для наибольшей активности необходимы ионы Cl^- [30]. АПФ содержит 1 прочно связанный ион Zn^{2+} на каждый активный центр и сильно ингибируется хелатирующими агентами, такими как ЭДТА и о-фенантролином [61]. Фермент ингибируется брадикининпотенциирующим фактором (K_i 40 нМ), дитиотреитолом, 2-меркаптоэтанолом и додецилсульфатом натрия. N-этилмалеимид, бацитрацин, пуромицин, фосфорамидон, тиорфан, ингибитор металл-зависимых основных карбоксипептидаз ГЭМЯК не имеют влияния на его активность [10]. Уже есть целый класс пептидных аналогов субстратов АПФ с K_i порядка 10-50 нМ, наиболее известные из них каптоприл ($IC_{50} \approx 20$ нМ), еналаприл (IC_{50} 25-35 нМ), лизиноприл (IC_{50} 3-10 нМ) [49].

Фермент *in vitro* ускоряет расщепление более 30 биологически активных пептидов и их предшественников [75]. Он изменяет ангиотензин I в ангиотензин II (Km 4-70 мкМ), отлепляет два дипептида с С-конца брадикинина, расщепляет неокиоторфин с образованием киоторфина (K_m 0,58 мМ), Met-энкефалин-Arg^6-Phe^7 с образованием Met-энкефалина (K_m 0,30 мМ), вещество Р и вещество К, холецистокинин и гастрин, энкефалин, нейротензин, нейрокинины А и В, рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона. АПФ ускоряет образование Met-энкефалин-Arg^6 из Met-энкефалин-Arg^6-Gly^7-Leu^8, отлепляет последовательно два дипептида с С-конца динорфина А 1-8, расщепляет натрийуретический фактор из мозга и предсердий, вазопрессин, окситоцин [23, 57].

Активность АПФ *in vitro* блокируется многими биологически активными пептидами и их предшественниками: неокиоторфином, Met-энкефалин-Arg^6-Phe^7, β-липотропином, веществом Р, брадикинином, Leu-энкефалин-Arg^6 и некоторыми дипептидами [10].

АПФ находится в тканях человека и животных. Наиболее высокий уровень АПФ обнаружен в лёгких и семенниках, в почках активность АПФ примерно в 25 раз меньше, чем в лёгких. В сыворотке крови активность АПФ примерно в 200 раз ниже, чем в лёгких [18]. Активность фермента в мозге сопоставима с активностью в почках. Самое высокое содержание АПФ найдено в гипофизе и стриатонигральном тракте. АПФ сконцентрирован в основном в синаптосомах [43]. В стриатонигральном тракте фермент связан с фракцией мембран, в которых содержатся мускариновые рецепторы, также в этой фракции обнаруживается только нейрональная, но не эндотелиальная форма АПФ. Следовательно, на мембранах дендритов сконцентрирована только нейрональная форма АПФ [41].

Установлено, что АПФ является компонентом ренин-ангиотензиновой системы. Он втягивается в обмен ангиотензина и брадикинина в удаленных от центра органах и тканях и становится важным звеном регулирования водно-солевого баланса, воспалительных процессов и артериального давления [60]. Также обнаружено, что АПФ вовлекается в определение эмоционального статуса животных, предрасположенности к потреблению этанола, устойчивости к стрессу [12] и агрессивности [16]. Мозговой АПФ втягивается в формирование наследственной гипертонии, в ответ на воздействие факторов стресса [5, 27] и потребление этанола [17]. Ингибиторы АПФ влияют на потребление воды и этанола, усиливают анальгетическую активность Met-энкефалин-Arg^6-Leu^7 и уничтожают его деградацию в мозге. Каптоприл, также является антидепрессантом, его антидепрессивный эффект блокируется налоксоном, он усиливает анальгетические эффекты Met- и Leu-энкефалинов, это усиление тоже блокируется налоксоном [68]. То, что АПФ участвует в некоторых физиологических и патологических процессах, а также многие из перечисленных эффектов, которые вызваны введением его ингибиторов, нельзя объяснить, если представить, что единственной функцией АПФ

является участие в обмене ангиотензинов и брадикинина. Можно предположить, что АПФ вовлекается в обмен и других регуляторных пептидов [10], это также подтверждается и высокой активностью фермента в мозге.

1.2.3 Лейцинаминопептидаза

Лейцинаминопептидаза (КФ 3.4.11.1) проявляет широкую специфичность и отлепляет практически любые N-концевые аминокислоты, за исключением аланина и цистеина [56]. Она гидролизует амид лейцина лучше, чем ариламид лейцина, с меньшей скоростью расщепляет лизин- и аргининамид. Фермент имеет по данным Хрусталёвой [36] и Fraticante и соавт [51]. Молекулярную массу около 62 кДа, по данным Shimamura и соавт. [74] – 53000, по данным Gibson и соавт [56] – 270 кДа, это позволяет предположить существование субъединичной структуры. Фермент наиболее активен при нейтральных и слабощелочных значениях pH, активируется ионами Mn^{2+}, ингибируется ПХМФС, бестатином и амастатином; пуромицин и арфаменин А не влияют на его активность [72]. Фермент отлепляет остаток тирозина от Tyr-Gly-Gly, Tyr-Gly-Gly-Phe, Leu-энкефалина, динорфина-(1-8), динорфина-(1-10) и динорфина-(1-13), наибольшая скорость расщепления происходит в случае Leu-энкефалина, если цепь удлинить, то скорость расщепления субстрата резко уменьшается [56]. Активность фермента равномерно распределена между серым и белым веществом коры полушарий. Его обнаружили и в цитозольной и в мембранной фракциях головного мозга, самая большая активность найдена в миелине. Возможно, что лейцинаминопептидазе принадлежит важная роль в инактивации энкефалинов, вещества Р и большинства других регуляторных пептидов [36, 48].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал и условия проведения исследований

Венозную кровь человека набирали в шприц из локтевой вены. Центрифугировали ее при 4000 g 10 мин, 4 °С, получали сыворотку, замораживали и хранили при -40° С. Чтобы провести исследование, сыворотку нагревали до 4° С, нингидринположительные компоненты удаляли, пропуская сыворотку через колонку с сефадексом G-25. Потом разводили сыворотку физиологическим раствором 1:1.

2.2.1 Общая схема исследования

В исследовании участвовали спортсмены ГОУ ДОД Школа высшего спортивного мастерства г. Пензы. Специализация спортсменов - легкая атлетика, а именно средний бег и триатлон. Квалификации - мастер спорта и мастер спорта международного класса. Выбирались спортсмены без заболеваний, которые были бы связаны с нарушением обмена веществ.

Также в исследовании участвовали студенты и аспиранты вузов г. Пензы, у которых не было систематических физических нагрузок. Возраст участников 18-28 лет, количество человек одинаковое (n=18). Уровень регуляторных периодов определяли в сыворотке крови и венозной крови. Каждая группа делилась на две подгруппы – интактную и экспериментальную, которая выполняла физическую работу [77].

2.2.2 Методы моделирования физической работы

Физическая работа для экспериментальных подгрупп спортсменов и людей, не имеющих систематических физических нагрузок, создавалась с помощью программируемого тредбана, начиналась со скорости 3,5 м/с, повышалась каждые две минуты на 0,5 м/с до скорости, когда пульс

поднимался до 180. На этой скорости испытуемый бежал до состояния полного утомления.

2.2.4 Методы определения активности протеолитических ферментов

2.2.4.1 Определение активности карбоксипептидазы Е

Активность КПЕ определяли модифицированным методом Fricker и Snyder [62]. 50 мкл гомогената ткани добавляли к 150 мкл (в случае опытной пробы) 50 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 5,6, содержащего 50 мМ NaCl или к смеси 140 мкл вышеуказанного буфера и 10 мкл 25 мкМ водного раствора ингибитора ГЭМЯК (в случае контрольной пробы). Далее пробы проинкубировали 8 минут при 37˚ С. Начинали реакцию прибавлением 50 мкл нагретого до 37˚ С 210 мкМ раствора дансил-фен-ала-арг, приготовленного на воде (конечная концентрация в реакционной смеси 42 мкМ). Пробы инкубировали 60 минут при 37˚С. Останавливали реакцию прибавлением 50 мкл 1М раствора HCl.

Для экстракции продукта реакции дансил-фен-ала приливали к пробам по 1,5 мл хлороформа, сильно встряхивали в течение 60 с. Хлороформную и водную фазы разделяли центрифугированием в течение 10 минут при 1000об/мин.

Флюоресценцию хлороформной фазы измеряли на флюориметре флюорат АБЛФ-Т при λ_{ex}=360 нм и λ_{em}=530 нм в кювете толщиной 1 см. Для приготовления стандартов использовали раствор дансил-фен-ала в хлороформе [40].

Определяли активность фермента, как разность прироста флюоресценции в пробах, не содержащих и содержащих ГЭМЯК, и выражали в нмоль дансил-фен-ала, образовавшегося за 1 минуту инкубации в пересчете на 1 мг белка [73].

2.2.4.2 Определение активности фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы

Активность ФМСФ-КП определяли флюориметрически [11] с использованием дансил-фен-лей-арг в качестве субстрата. В контрольные пробы вносили 140 мкл 50 мМ натрий-ацетатного буфера, содержащего 50 мМ NaCl, pH 5,6, 50 мкл препарата фермента и 10 мкл 25 мМ ФМСФ, приготовленного на этаноле. После внесения препарата фермента в реакционную смесь вносили ФМСФ. Опытные пробы содержали 150 мкл указанного буфера и 50 мкл препарата фермента. Пробы проинкубировали 8 мин при 37^{o}C, затем вносили 50 мкл предварительно нагретого до 37^{o}C 210 мкМ раствора дансил-фен-лей-арг, приготовленного на воде. Далее пробы обрабатывали как описано для КПН [65]. Для приготовления стандартов использовали раствор дансил-фен-лей в хлороформе.

Активность фермента определяли как разницу прироста флюоресценции в пробах, не содержащих и содержащих ФМСФ, и выражали в нмоль дансил-фен-лей, образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

2.2.4.3 Определение активности лизин-карбоксипептидазы

Активность ЛКП определяли по отщеплению Arg от карбоксибензоил-Gly-Arg, в качестве ингибитора использовали ГЭМЯК. К и 40 мкл сыворотки добавляли 20 мкл (в случае опытной пробы) 100 мМ трис-HCl буфера, pH 7,6, или (в случае контрольной пробы) 20 мкл 12,5 мкМ р-ра ГЭМЯК в таком же буфере. Пробы инкубировали 8 мин при 37ºС. Реакцию начинали прибавлением 10 мкл карбоксибензоил-Gly-Arg (концентрация в пробе 3.65 мкМ) в 100 мМ трис-HCl буфера, pH 7,6. Пробы инкубировали 120 мин при 37ºС. Реакцию останавливали прибавлением 30 мкл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Осадок отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 4000 об/мин. Затем отбирали по 50 мкл надосадочной жидкости и определяли количество образовавшегося продукта по приросту свободных

аминогрупп нингидриновым методом, учитывая разницу оптической плотности между опытными и контрольными пробами [15]. Для приготовления стандартов использовали раствор аргинина в в 100 мМ трис-HCl буфере, pH 7,6. Активность фермента выражали в нмоль продукта в расчете на 1 мин инкубации и 1 мг белка.

2.2.4.4 Определение активности пептидил-дипептидазы А

Активность ПДА определяли по отщеплению Gly-Arg от карбоксибензоил-Gly-Gly-Arg при pH=8,2, с использованием каптоприла в качестве ингибитора [20].

Опытные пробы содержали 40 мкл разведенной сыворотки и 20 мкл 100 мМ трис-HCl. Контрольные пробы содержали каптоприл в конечной концентрации 10 мкМ. Пробы инкубировали 8 мин при 37ºС, затем вносили по 10 мкл карбоксибензоил-Gly-Gly-Arg (концентрация в пробе 3.65 мкМ) в том же буфере. Пробы инкубировали 120 мин при 37ºС. Реакцию останавливали прибавлением 30 мкл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Осадок отделяли центрифугированием в течение 20 мин при 4000 об/мин. Затем отбирали по 50 мкл надосадочной жидкости, активность фермента определяли нингидриновым методом [15, 22] как разницу прироста оптической плотности в пробах, не содержащих и содержащих каптоприл. Для приготовления стандартов использовали раствор аргинина в в 100 мМ трис-HCl буфере, pH 7,6. Активность фермента выражали в нмоль продукта в расчете на 1 мин инкубации и 1 мг белка.

2.2.4.5 Определение активности лейциламинопептидазы

Для определения активности ЛАП к 90 мкл сыворотки прибавляли 10 мкл раствора пуромицина, приготовленного на соответствующем буфере (в случае опытной пробы) и 10 мкл 20 мМ фосфатного буфера, pH 7,4 (в случае контрольной пробы). Проводили преинкубацию 8 мин при 37˚С. Реакцию

начинали прибавлением 100 мкл 310 мкМ раствора лей-β-нафтиламина, приготовленного на буфере. Через 30 мин реакцию останавливали прибавлением 40 мкл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Пробы центрифугировали 30 мин при 4000 об/ мин, отбирали 100 мкл надосадочной жидкости, добавляли по 1,5 мл натрий-ацетатного буфера (pH 4,2). Определяли флюоресценцию образовавшегося β-нафтиламина на флюориметре ФМЦ-2 при λex=360 нм и λem=420 нм в кювете толщиной 1 см. Активность фермента определяли по разнице прироста флюоресценции в пробах, не содержащих и содержащих пуромицин, и выражали в нмоль β-нафтиламина, образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

2.2.5 Определение концентрации регуляторных пептидов

Содержание регуляторных пептидов осуществлялось различными вариантами иммуноферментного анализа с использованием готовых наборов, изготовленных на заказ фирмой DRG International (Германия) [14].

2.2.6 Методы статистической обработки

Проверка принадлежности распределения признаков к нормальному распределению производилась по критерию хи-квадрат. Достоверность отличий между средними определяли с использованием t-критерия Стьюдента. Анализ отсроченного влияния препаратов, а также физической работы на активность пептидгидролаз проводили с использованием дисперсионного анализа. Принадлежность подгрупп животных к разным гомогенным группам оценивали с помощью метода Шеффе. Сравнение значений каждой из подгрупп дисперсионного комплекса проводили по методике Ньюмена-Кейлса. Корреляционный анализ проводили с помощью эмпирического критерия корреляции.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Влияние физической работы на уровень регуляторных пептидов в крови спортсменов и людей, не занимающихся спортом

Одной из актуальных задач функциональной биохимии является комплексное изучение биохимических процессов при различных физиологических состояниях, характеризующихся разной спецификой регуляции обменных реакций. К настоящему времени достигнуты значительные успехи в раскрытии особенностей влияния физической активности на показатели функционирования пептидергической системы, однако имеется большое количество работ, свидетельствующих о разнонаправленных изменениях индивидуальных исследуемых показателей при сходных воздействиях, что связано, по-видимому, с различными моделями и схемами экспериментов. Все это затрудняет понимание роли пептидергической системы в единой интегративной системе регуляции биологических процессов и функций. В нашей работе мы уделили особое внимание регуляторным пептидам, участвующих в ключевых точках взаимодействия пептидергических и других регуляторных систем, обеспечивающих адаптацию к физической работе у высококвалифицированных спортсменов и у людей, не подвергающихся систематической физической нагрузке. Понимание различий в отклике системы регуляторных пептидов на совершение интенсивной физической работы между группами людей, адаптированными и неадаптированными к ней, позволит оценить значимость каждого компонента в приспособительных реакциях [26].

3.1.1 Роль белковых гормонов, ростовых факторов, регуляторных пептидов и ферментов их обмена в регуляции метаболизма при физической работе

У спортсменов высокой квалификации не наблюдалось отличий по содержанию люлиберина, ЛГ, ФСГ, пролактина и тестостерона в сыворотке крови от соответствующих показателей нетретренированных людей ни в покое, ни при физической работе (рис. 1 и 2). У обеих исследуемых групп уровни этих регуляторных пептидов повышались при нагрузке на одинаковую величину – на 40, 90, 80 и 70 % соответственно.

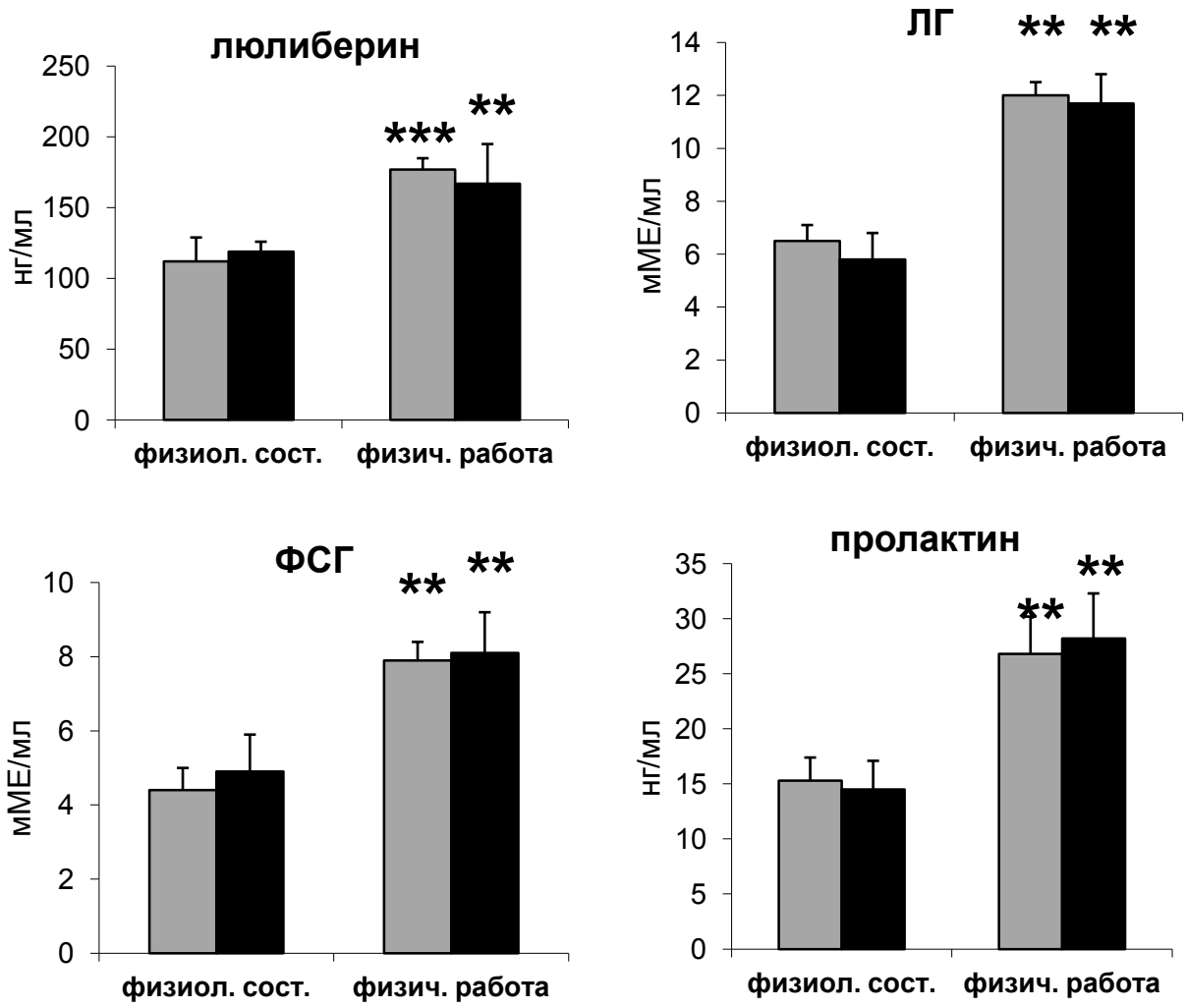

Рисунок 1. Влияние физической работы на уровень люлиберина, лютеинизирующего (ЛГ), фолликулостимулирующего (ФСГ) гормонов и пролактина в сыворотке крови спортсменов и людей, не занимающихся спортом.

Таким образом, существенных перестроек в функционировании системы половых тропных гормонов при адаптации к физической работе не происходит. По-видимому, обеспечение оптимального функционирования репродуктивной системы исключает возможность адаптационных сдвигов в процессах синтеза и секреции ее регуляторных компонентов при систематической физической работе.

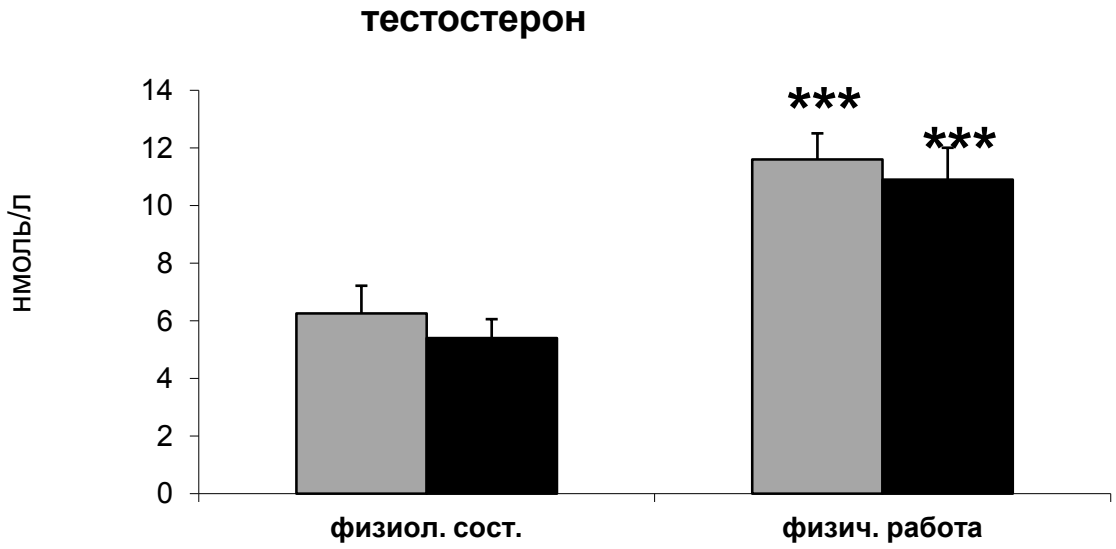

Рисунок 2. Влияние физической работы на уровень тестостерона в сыворотке крови спортсменов и людей, не занимающихся спортом.

Тем не менее, можно предположить важную роль систематических кратковременных повышений концентраций люлиберина, ЛГ, ФСГ и пролактина при физической работе, поскольку данные пептиды в системе с половыми стероидными гормонами оказывают мощное влияние на мотивационное поведение, а также являются важными компонентами, определяющими статус катаболизм/анаболизм [9, 21, 33]. Данные изменения существенно отличаются от направленности процессов, наблюдаемых при стрессорных воздействиях, характеризующихся снижением синтеза и секреции половых тропных гормонов и андрогенов [66]. Несмотря на сходства со стресс-реакцией в процессах активизации секреции АКТГ,

глюкокортикоидов и опиоидных пептидов [32], обладающих способностью тормозить образование половых гормонов на уровне гипофиза и гонад [7], физическая работа, по-видимому, вызывает активацию синтеза ЛГ, ФСГ, пролактина на уровне протеолитического процессинга готовых форм пропептидов секреторных везикул, что является, вероятно, единственным способом поддержания высокого уровня образования гонадотропинов и половых стероидов при высоких концентрациях гормонов стресса.

Уровни СТГ и ТТГ спортсменов высокой квалификации не отличались от показателей группы здоровых добровольцев ни в состоянии покоя, ни после физической работы (рис. 3).

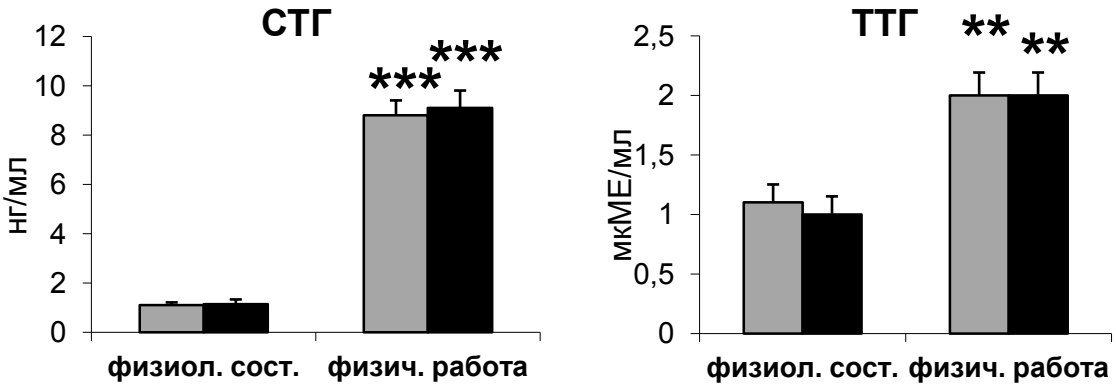

Рисунок 3. Влияние физической работы на уровень соматотропного (СТГ) и тиреотропного (ТТГ) гормонов в сыворотке крови спортсменов и людей, не занимающихся спортом.

Физическая работа вызывала повышение уровней соматотропина и тиротропина у обеих исследуемых групп на 90% и 100% соответственно. Несмотря на вызываемые физической активностью повышение синтеза и секреции данных гормонов, отсутствие адаптационной перестройки в системе их образования у спортсменов, по-видимому, обусловлено наличием широкого спектра физиологической активности у СТГ и ТТГ, а также наличием большого количества регуляторных факторов, опосредующих

частные функции гормонов [3,19]. Повышение уровня тиротропина при физической работе, в первую очередь, вероятно, связано с поддержанием постоянного уровня гормонов щитовидной железы (табл. 1), синтез которых существенно снижен в присутствии высоких концентраций глюкокортикоидов [1, 37, 69].

Таблица 1– Влияние физической работы на уровень трийодтиронина (Т-3) и тироксина (Т-4) в сыворотке крови спортсменов и людей, не занимающихся спортом (M±m).

	Спортсмены		Неспортсмены	
	Норма	физ. работа	норма	физ. работа
Т-3, мкг/мл	0,66±0,06	0,74±0,08	0,71±0,1	0,73±0,09
Т-4, мкг/дл	8,5±1,01	9,7±0,94	8,8±0,78	8,1±0,92

Важная роль принадлежит участию СТГ и ТТГ в активации функций нервной системы, влиянием на болевую чувствительность, мотивацию, память, процессы обучения, модуляции синтеза и секреции других регуляторных пептидов и факторов роста [28, 34, 63].

Интересным представляется вопрос о механизмах регуляции уровня соматотропина и тиротропина при повышенных концентрациях глюкокортикоидов, обладающих выраженным ингибирующим влиянием на их синтез и секрецию [39]. Сохранение высоких плазматических концентраций гонадных, ростовых и тиреоидных гормонов пептидной природы в присутствии высоких концентраций кортизола и кортикостерона является важнейшим адаптационным механизмом при физической работе, для раскрытия деталей которого необходимо изучение активности пептидгидролаз, участвующих в их обмене, в норме и при физической работе.

В состоянии покоя уровень IGF-1 и TGF-α у спортсменов высокой квалификации был выше, чем у неспортсменов на 30% и 45% соответственно (рис. 4).

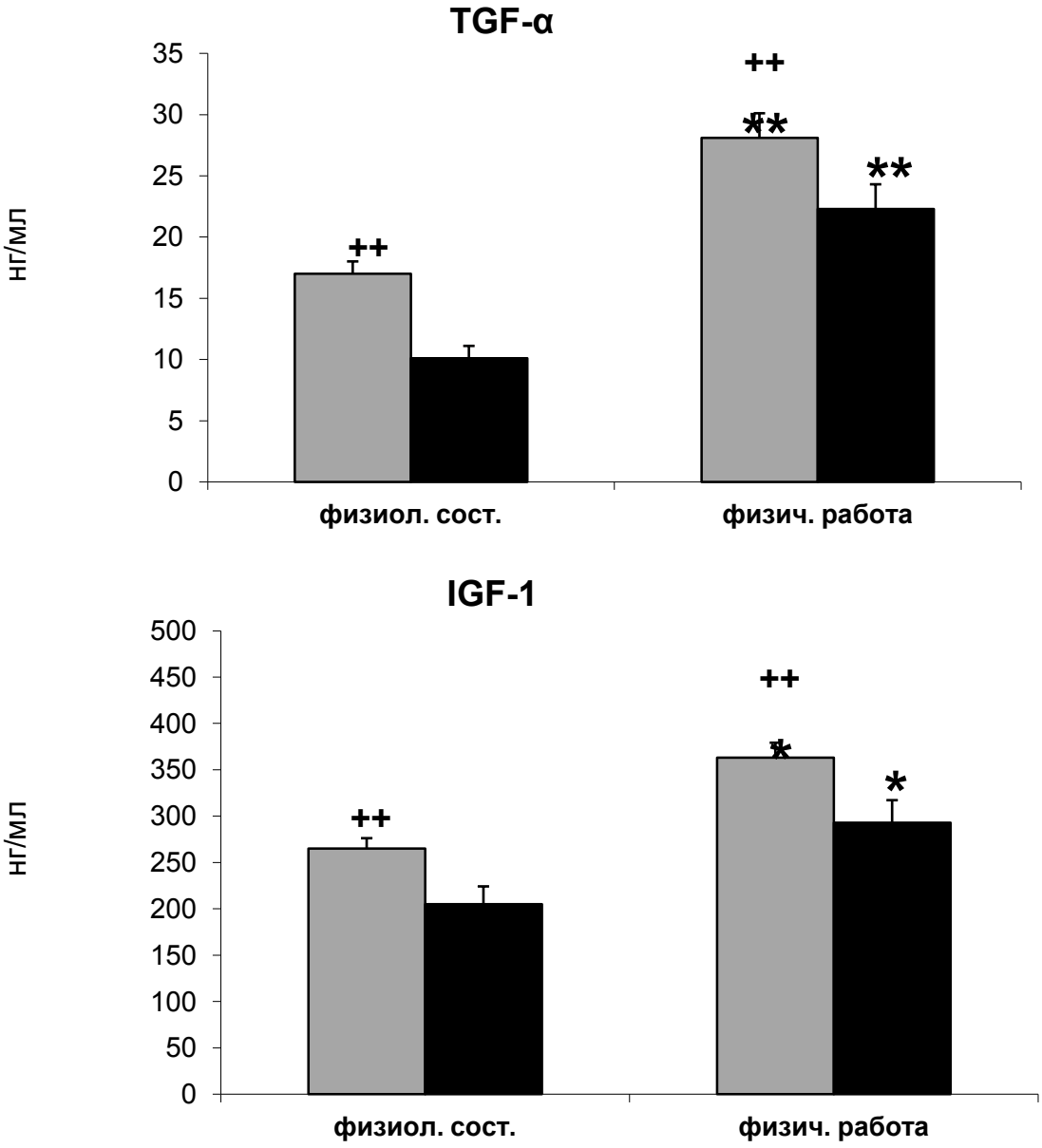

Рисунок 4. Влияние физической работы на уровень инсулиподобного фактора роста (IGF-1) и трансформирующий фактор роста α (TGF-α) в сыворотке крови спортсменов и людей, не занимающихся спортом.

Физическая работа вызывала более выраженное повышение уровня TGF-α у неспортсменов (на 110%), чем у спортсменов, уровень TGF-α которых увеличивался примерно на 60 %. У обеих экспериментальных групп физическая работа вызывала повышение уровня IGF-1 примерно на 40%. Таким образом, плазматический уровень ростовых факторов у спортсменов высокой квалификации выше, чем у группы здоровых добровольцев и в состоянии покоя и при физической работе, что свидетельствует о вовлечении данных пептидов в восстановительные и цитопротекторные реакции, способствующие адаптации организма к высокой физической активности. IGF-1 и TGF-α оказывают протективный эффект при повреждениях мозга, защищают нервные клетки от экзайтотоксичности глутамата и NMDA, способствуют репарационным процессам в нервной системе [47, 55].

Содержание вещества Р в сыворотке крови спортсменов в покое было на 60% выше, чем у неспортсменов (рис. 5). При физической работе у спортсменов не наблюдалось изменений в его концентрации, в то время как у неспортсменов происходило повышение уровня вещества Р на 60%.

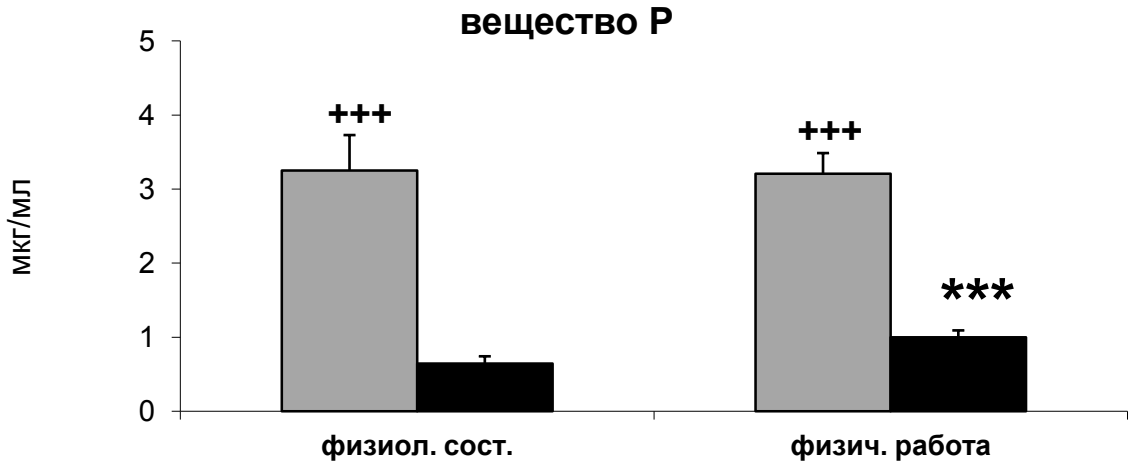

Рисунок 5. Влияние физической работы на уровень вещества Р в сыворотке крови спортсменов и людей, не занимающихся спортом.

Вещество Р обладает широким спектром физиологической активности: регулирует артериальное давление крови, капиллярную проницаемость, сокращение гладкой мускулатуры, обладает секретогенным действием, регулирует высвобождение пролактина и пищеварительных гормонов [29]. Отмечена важная роль в регуляции функций нервной системы – участие в передаче сенсорной информации, модуляции болевой чувствительности, в процессах запоминания и воспроизведения информации, причем значительная часть информации о биологической роли вещества Р получена в экспериментах по моделированию физической работы [35, 69]. Эти факты, а также данные о существенном увеличении уровня вещества Р в сыворотке крови спортсменов по сравнению с группой здоровых добровольцев свидетельствуют о важной роли пептида в адаптации к физической работе.

3.1.2 Активность пептидил-дипептидазы А, лизин-карбоксипептидазы и лейциламинопептидазы

Активность пептидил-дипептидазы А, лизин-карбоксипептидазы и лейциламинопептидазы у спортсменов в физиологическом состоянии была выше, чем у людей, не занимающихся спортом (рис. 6).

После физической работы у спортсменов не наблюдалось изменений в активности исследуемых ферментов, в то время как у неспортсменов происходило повышение активности данных пептидгидролаз. Существенное повышение активности пептидгидролаз сыворотки крови при физической нагрузке у здоровых добровольцев, а также отличия в активности ферментов у спортсменов и неспортсменов в состоянии покоя свидетельствуют об участии данных пептидгидролаз в регуляции уровня регуляторных пептидов, ростовых факторов и гормональных белков при физической работе и адаптационных перестройках функционирования пептидергической системы.

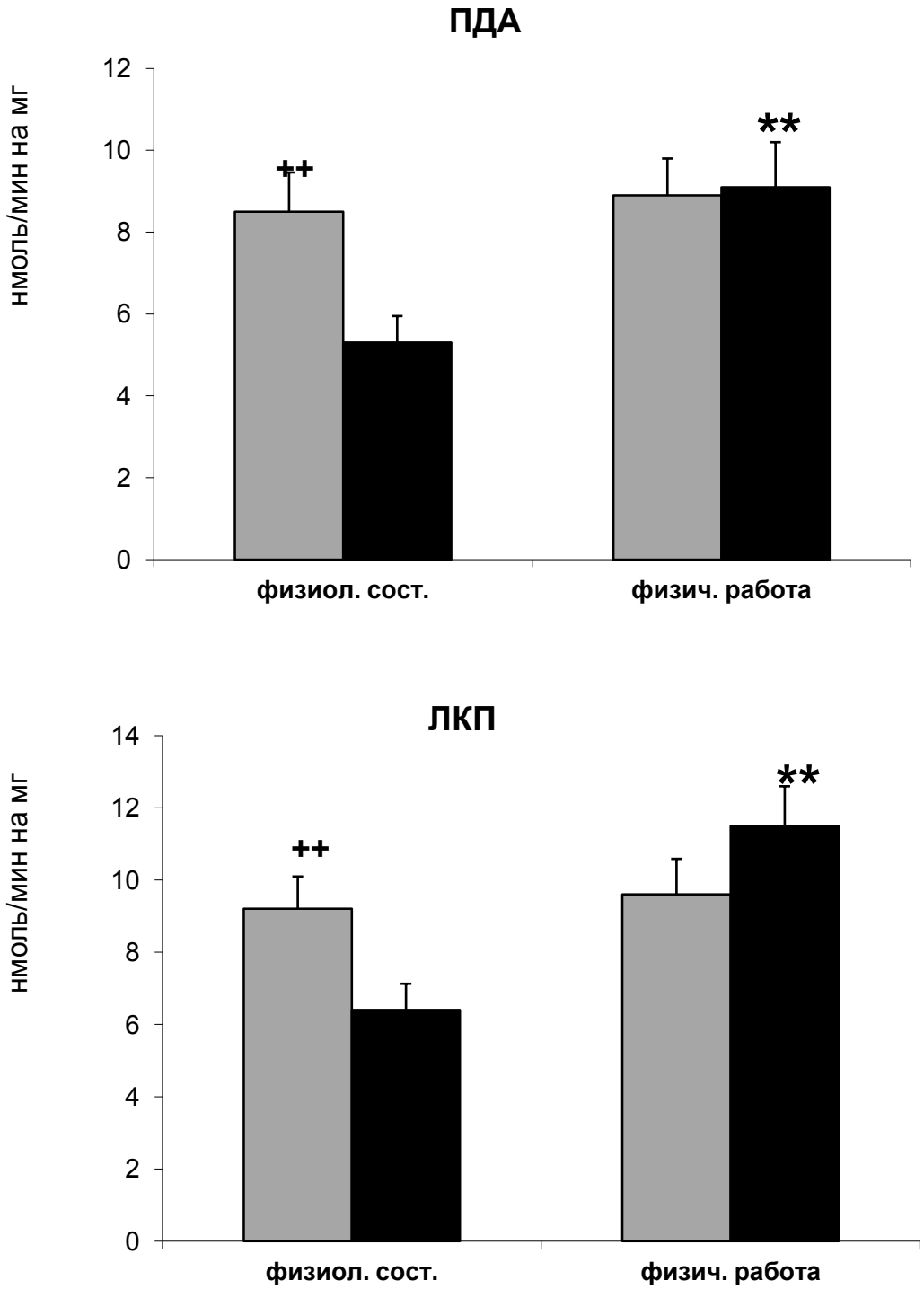

Рисунок 6. Влияние физической работы на активность пептидил-дипептидазы А (ПДА), лизин-карбоксипептидазы (ЛКП) и лейциламинопептидазы (ЛАП) в сыворотке крови спортсменов и людей, не занимающихся спортом.

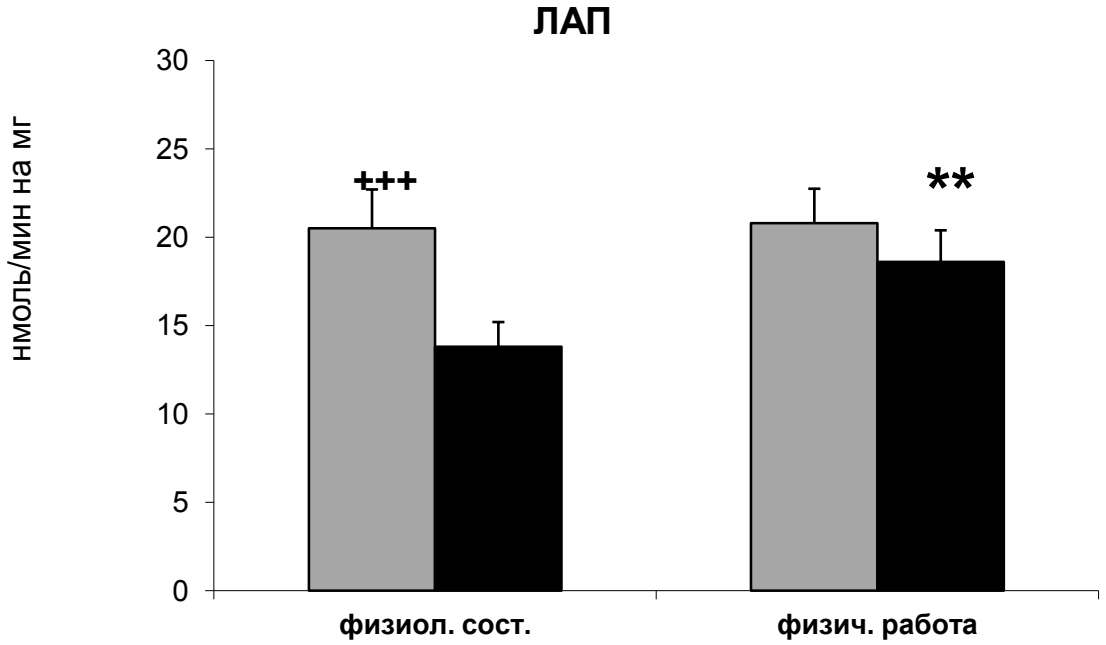

Рисунок 7. Влияние физической работы на активность пептидил-дипептидазы А (ПДА), лизин-карбоксипептидазы (ЛКП) и лейциламинопептидазы (ЛАП) в сыворотке крови спортсменов и людей, не занимающихся спортом.

Интересным представляется вопрос о механизмах влияния физической работы на активность изучаемых ферментов. Известно, что глюкокортикоиды регулируют активность многих ферментов путём изменения экспрессии их генов. Однако к настоящему времени вопрос о возможности влияния глюкокортикоидов на уровень экспрессии ПДА, ЛКП и ЛАП остается до конца не изученным [21, 69]. Повышенный уровень глюкокортикоидов у спортсменов высокой квалификации в состоянии покоя и наблюдаемое при физической работе увеличение концентрации кортизола и кортикостерона у здоровых добровольцев коррелирует с повышенной активностью ферментов. Эти данные, наряду с публикациями о корреляции между уровнем глюкокортикоидов и активностью пептидгидролаз [11, 53, 76] свидетельствуют о высокой вероятности подобного способа регуляции активности ПДА, ЛКП и ЛАП при физической работе. Вместе с тем, многие

нейропептиды влияют на экспрессию генов, в том числе генов пептидгидролаз [3]. Следовательно, изменение уровня нейропептидов при физической работе вследствие выброса биологически активных форм из секреторных гранул может приводить к изменению активности пептидгидролаз, посредством влияния этих нейропептидов на уровень экспрессии мРНК ферментов.

Таким образом, физическая работа вызывала существенное увеличение плазматических концентраций всех исследуемых пептидов и белков, кроме того, наблюдались выраженные отличия в уровнях инсулина, глюкагона, лептина, АКТГ, IGF-1, TGF-α и вещества Р у спортсменов и неспортсменов в состоянии покоя. Несмотря на сходство наблюдаемых изменений с данными, характерными для стресс-реакции, физическая работа характеризуется увеличением уровней ростовых, гонадотропных и тиреотропных пептидов, синтез и секреция которых существенно подавляется при всех видах стресса. Наиболее вероятным механизмом увеличения продукции данных нейропептидов при физической работе в условиях высоких концентраций глюкокортикоидов является активация протеолитического процессинга предшественников биологически активных форм пептидов данной группы. Отличия в активности пептидил-дипептидазы А, лизин-карбоксипептидазы и лейциламинопептидазы у спортсменов и неспортсменов, а также повышение активности данных ферментов при физической нагрузке у здоровых добровольцев частично подтверждают данную гипотезу. Тем не менее, по причине локализации синтеза большинства исследованных пептидов в отделах головного мозга, для более полного выяснения механизмов адаптивного увеличения уровней регуляторных пептидов при физической работе, необходимо исследование активности пептидгидролаз в нервной системе при физической работе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Физическая работа, которая вызывает существенную активацию пептидергической системы, проявляющуюся, прежде всего, увеличением плазматической концентрации регуляторных пептидов, гормонов и ростовых факторов, участвующих в адекватной активизации метаболизма возрастающим энергетическим потребностям, модулирующих функциональную активность нервной системы и выполняющих цитопротекторные функции.

2. В увеличении содержания регуляторных пептидов в сыворотке крови важную роль играет активизация процессов протеолитического процессинга и модификации биологически активных форм пептидов, о чем свидетельствует высокая положительная корреляция между сдвигами уровней пептидов и активностью пептидгидролаз сыворотки крови.

3. Впервые показано, что пептидергическая система спортсменов высокой квалификации функционирует более активно, чем у неспортсменов, что выражается в существенных различиях в активности пептидгидролаз, уровне большинства регуляторных пептидов и контролируемых ими показателях в состоянии покоя.

4. Физическая работа вызывает менее выраженные изменения в уровне регуляторных пептидов и активности ферментов их обмена у спортсменов, чем у людей, не занимающихся спортом, при более выраженных сдвигах в содержании метаболитов и показателях КОС, что свидетельствует о высокой адаптационной значимости различий в функционировании пептидергической системы у этих исследуемых групп в состоянии покоя.

5. Одним из основных биохимических механизмов, лежащих в основе увеличения физической работоспособности при систематической физической работе, может служить выявленная нами перестройка функционирования системы синтеза и модификации регуляторных пептидов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Каразеева Е.П. Нейропептиды // в кн. “Нейрохимия” под ред. Ашмарина И.П., Стукалова П.В. М.: Издательство института биомедицинской химии РАМН, 1996. 296-333 с.

2. Бабичев В.Н. Нейроэндокринный контроль процессов пубертации // Усп. совр. биол. 1994. 114 с, № 3. 330-344 с.

3. Бабичев В.Н., Миронов С.Ф. Нейропептиды мозга и их нейроэндокринные эффекты // Пробл. эндокринол. 1981. № 3. 78-85 с.

4. Блум Ф., Лейзерсон А., Хофстедтер Л. Мозг, разум и поведение / Пер. с англ. М.: Мир, 1988. 248 с.

5. Бэйрд Д.Т. Яичник / Гормональная регуляция размножения у млекопитающих. М.: Мир. 1987. 118-144 с.

6. Вернигора А.Н., Генгин М.Т. Механизм регуляции активности и биологическая роль карбоксипептидазы Н – фермента процессинга нейропептидов // Биохимия 1995. 60 с, № 12. 1491-1497 с.

7. Вернигора А.Н., Генгин М.Т. Протеолитические ферменты: субклеточная локализация, свойства и участие в обмене нейропептидов // Биохимия. 1996. 61 с, № 5. 771-785 с.

8. Вернигора А.Н., Генгин М.Т., Никишин Н.Н. Об участии некоторых ферментов нейропептидов в механизмах эмоционального стресса // Физиол. журн. 1995. т.81. №5. 1025-1028 с.

9. Вернигора А.Н., Генгин М.Т., Никишин Н.Н. Множественность молекулярных форм растворимых карбоксипептидазо-В-подобных ферментов головного мозга кошки // Укр. биохим. журн. 1993. 65 с, № 4. 17-21 с.

10. Вернигора А.Н., Никишин Н.Н., Генгин М.Т. О взаимосвязи между активностью карбоксипептидазы Н и ангиотензинпревращающего фермента // Биохимия. 1995. 60 с, N 1. 144-149 с.

11. Генгин М.Т. Особенности структурно-функциональной организации и физико-химические свойства нелизосомальных пептидгидролаз мозга животных: Автореф. дис. … док. биол. наук. Пенза, 2002.

12. Генгин М.Т., Вернигора А.Н., Никишин Н.Н., Щетинина Н.В. Активность карбоксипептидазы N и ангиотензинпревращающего фермента в сыворотке крови крыс в норме и при эмоциональном стрессе // Укр. биохим. журн. 1994. 66 с, № 2. 139-142 с.

13. Генгин М.Т., Соловьев В.Б., Сметанин В.А., Пазялова А.А., Симкина О.В., Коновалов А.Н., Кузичкин Д.С., Шашкина Н.К., Генгина Н.М., Субботина К.Б. Влияние атропина на активность ангиотензин-превращающего фермента и карбоксипептидазы N в сыворотке крови крыс // Украинский биохимический журнал. 2005. Т. 77, № 6. 78-80 с.

14. Гомазков О.А. Функциональная биохимия регуляторных пептидов.– М.: Наука. 1993.

15. Гомазков О.А. Энзимологические основы физиологического действия регуляторных пептидов // Биологические науки. 1986. № 2. 13-23 с.

16. Гомазков О.А., Комиссарова Н.В., Петрий О.П., Панфилов А.Д. Возрастные и регионарные изменения ангиотензинпревращающей и кининдеградирующей активности в мозге агрессивных крыс // Бюлл. эксперим. биол. мед. 1987. 104 , № 7. 18-20 с.

17. Гомазков О.А., Панфилов А.Д., Комиссарова Н.В., Ростовцев А.П. Влияние длительного потребления этанола на физиологическое

состояние и изменения активности пептидаз мозга у мурицидных (агрессивных) крыс // Журн. высш. нервн. деят. 1992. 42, № 4. Р. 771-777.

18. Гомазков О.А., Панфилов А.Д., Ростовцев А.П., Комиссарова Н.В., Фомин В.В., Григорьянц О.О. Регионарная активность энкефалин- и ангиотензин II-образующих пептидаз мозга и периферических тканей у крыс с различным влечением к этанолу // Вопр. мед. химии. 1991. 37, N 4. 33-37 с.

19. Гормонотерапия: Пер. с нем. / Под ред. Шамбаха Х., Кнаппе Г., Карола В. М.: Медицина, 1988, 416 с.

20. Дмитриев А.Д. Биосинтез нейропептидов // Итоги науки и техники ВИНИТИ. Фармакол. химиотерапевт. средства. 1982. 43. 7-49 с.

21. Држевецкая И.А. Основы физиологии обмена веществ и эндокринной системы. М.: Высш. шк., 1994, 256 с.

22. Замятнин А.А. Общие функциональные особенности эндогенных регуляторных олигопептидов // Физиол. ж. 1992. 78, № 9. 39-49 с.

23. Звягинцева М.А. Роль пептида дельта-сна в электрической стабильности сердца // Кардиология. 1988. №3. 89-91 с.

24. Корнева Е.А. Регуляторные пептиды как модуляторы защитных функций организма // Физиол. ж. 1985. 75, № 5. 656-665 с.

25. Кост О.А., Ламзина Н.А., Казанская Н.Ф. Микрогетерогенность ангиотензин-превращающего фермента, как фактор регуляции его в организме // Механизмы регуляции клеточной активности: (Ташкент, 18 – 22 сент. 1989 г.): Тез. докл. Москва, 1989. 40 с.

26. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2-х томах. Пер. с англ. / Под ред. Гинодмана Л.М. М.: Мир, 1993.

27. Никишин Н.Н., Вернигора А.Н., Генгин М.Т. Активность ангиотензинпревращающего фермента в отделах головного мозга крыс, обладающих различной устойчивостью к эмоциональному стрессу в норме и при стрессе // Укр. биохим. журн. 1994. 66, № 5. 53-57 с.

28. Панченко Л.Ф., Брусов О.С., Беляев Н.А. Исследование механизма действия этанола на активность энкефалиназы А мозга крыс // Бюлл. эксперим. биол. мед.1984. 97, № 6. 691-692 с.

29. Реминяк В.И. Некоторые нейрохимические критерии прогноза эффективности терапии атропиновыми комами больных шизофренией // Тезисы докл. IX Всесоюз. конференции по биох. НС. 1983. Ереван.

30. Сахаров И.Ю., Данилов С.М., Духанина Е.А. Получение и молекулярно-кинетические свойства ангиотензинпревращающего фермента из сердца человека // Биохимия. 1986. 51, N 11. 1836-1842.

31. Соловьев В.Б., Генгин М.Т. Активность пептидил-дипептидазы А и карбоксипептидазы N в сыворотке крови пациентов с болезнью Альцгеймера // Украинский биохимический журнал. 2007. Т. 79, № 6. С. 103-105 с.

32. Судаков К. В. Олигопептиды в механизмах устойчивости к эмоциональному стрессу//Патол. физиология и эксперим. терапия.1989.- Вып. 1.3-11 с.

33. Сухоруков В.С., Тарабрин С.Б. Роль пролактина в регуляции функций мужской гонады // Усп. совр. биол. 1993. 113, № 3. 366-376 с.

34. Теппермен Дж., Теппермен У. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. Вводный курс: Пер. с англ. / Под ред. Ажипа Я.И. М.: Мир, 1989.

35. Федоров Б. М. Стресс и система кровообращения. -М.: Медицина, 1991. 320с

36. Хрусталева Н.А. Выделение, очистка, некоторые физико-химические свойства лейцинаминопептидазы миелина и диагностическое значение этого фермента при демиелинизирующих заболеваниях // Автореф. канд. дис. Москва. 1987.

37. Юматов Е.А. Пептидно-нейромедиаторные механизмы устойчивости к эмоциональному стрессу // Стресс и психологическая патология. М.: Московский НИИ психиатрии, 1983. 7-12 с.

38. Юматов Е.А., Гехт К., Скоцеляс Ю.Г. Субстанция Р как фактор устойчивости к эмоциональному стрессу // Журн. выс. нервн. деятельности. 1984. 34. 4. 771-777 с.

39. Azaryan A.V., Hook V.Y.H. Distinct properties of prohormone thiol protease (Ptp) compared to cathepsin B, cathepsin L, and cathepsin H - evidence for Ptp as a novel cysteine protease // Arch. Biochem. Biophys. 1994. 314, N 1. P. 171-177 c.

40. Azaryan A.V., Hook V.Y.H. Unique cleavage specificity of prohormone thiol protease related to proenkephalin processing // FEBS Lett. 1994. 341, N 2-3. P. 197-202 c.

41. Barnes K., Turner A.J., Kenny A.J. Membrane localization of endopeptidase-24.11 and peptidyl dipeptidase A (angiotensin converting enzyme) in the pig brain: a study using subcellular fractionation and electron microscopic immunocytochemistry // J. Neurochem. 1992. 58, N 6. P. 2088-2096.

42. Bouassida A. et al. // J. of Sports Science and Med. 2006, V 5, P. 172 – 181 c.

43. Clemens D.L., Okamura T., Inagami T. Subcellular localization of angiotensin-converting enzyme in cultured neuroblastoma cells // J. Neurochem. 1986. 47, N 6. P. 1837-1842.

44. Chesselet M.F., Hook V.Y. Carboxypeptidase H-like immunoreactivity in the striatum of cats and monkeys // Regul. Pept. 1988. 20, N 2. P. 151-159 c.

45. Davidson H.W., Hutton J.C. The insulin-secretory-granule carboxypeptidase H: Purification and demonstration of involvement in proinsulin processing // Biochem. J. 1987. 245, N 2. P. 575-582 c.

46. Demmer W., Brand K. A dipeptidyl carboxypeptidase in brain synaptic membranes active in the metabolism of enkephalin containing peptides // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983. 114 c, N 2. P. 804-812.

47. Devi L. Tissue distribution of a dynorphin-processing endopeptidase // Endocrinology. 1993. 132 c, N 3. – P. 1139-1144.

48. Dupont A.. Sabord P., Merand G. el al. Age-related changes in central nervous system eukephalins substance P // Life Sci. 1981. Vol. 29. №22. P. 2317-2322.

49. Edwards C.R., Padfield P.L. Angiotensin-converting enzyme inhibitors: past, present and bright future // Lancet. 1985. 8419. 30-34 c.

50. Erdos E.G., Skidgel R.A. Angiotensin-I-converting enzyme // Lab. Inuest. 1987. 56, N 4. 345-348 c.

51. Fraticante L.I., Rotrosen I., Siekiorski I., Fracer H., Gershon S. Enkephalin inactivation by N-terminal tyrosine cleavage: purification and partial characterisation of a highly specific enzyme from human brain // Life Sci. 1980. 26, N 20. P. 1697-1706.

52. Fricker L.D., Plummer T.H., Snyder S.H. Enkephalin convertase: potent, selective and irreversible inhibitors // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. 11, N 3. P. 994-1000.

53. Fricker L.D., Snyder S.H. Enkephalin convertase: purification and charasterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenall chromaffin granules // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. 79. P. 3886-3890.

54. Fricker L.D., Snyder S.H. Purification and characterization of enkephalin convertase, an enkephaline-synthesizing carboxypeptidase // J. Biol. Chem. 1983. 258, N 18. P. 10950-10955.

55. Gainer H., Russel J.T., Loh Y.P. The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: the secretory vesicle hypothesis // Neuroendocrinology. - 1985. 40, N 1. P. 171-184.1992. 131, N 3.

56. Gibson A.M., Biggins J.A., Lauffart B., Mantle D., McDermott J.R. Human brain leucyl aminopeptidase: Isolation, characterization and specificity against some neuropeptides // Neuropeptides. 1991. 19, N 3. P. 163-168.

57. Jukic D. Neurokinin receptors antagonists: old and new. // Life Sci. 1991, Vol. 49, P. 1463.

58. Hook V.Y. Carboxypeptidase B-like activity for the processing of enkephalin precursors in the membrane component of bovine adrenomedullary chromaffin granules // Neuropeptides. 1984. 4, N 2. P. 117-126 c.

59. Hook V.Y.H., LaGamma E.F. Product inhibit of carboxypeptidase H // J. Biol. Chem. 1987. 262, N 26. P. 12583-12588.

60. Hooper N.M. Angiotensin converting enzyme: implications from molecular biology for its physiological functions // Int. J. Biochem. 1991. 23, N 7/8. P. 641-647.

61. Hooper N.M., Turner A.J. Charasterization of angiotensin-converting enzyme from pig brain // Biochem. Soc. Trans. 1986. 14, N 6. P. 1249-1250.

62. Hughes J. (ed.). Centrally Acting Peptides, University Park Press, 1978. Iversen S.D., Iversen L.L. Behavioral pharmacology, Oxford University Press, second

63. Krause J. // PNAS USA 1987, Vol. 84, P. 881.

64. L.D. Peptide processing exopeptidases: amino- and carboxypeptidases involved with peptide biosynthesis // Peptide biosynthesis and processing (Fricker L.D. ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991. P. 199-230.

65. Loh Y.P., Birch N.P., Castro M.G. Pro-opiomelanocortin and pro-vasopressin converting enzyme in pituitary secretory vesicles // Biochimie. – 1988. 70, N 1. P. 11-16.

66. Loh Y.P., Parish D.C., Tuteja R. Purification and charasterization of a paired basic residue-specific pro-opiomelanocortin converting enzyme from bovine pituitary intermediate lobe secretory vesicles // J. Biol. Chem. 1985. 260, N 12.

67. Lynch D.R., Venable J.C., Snyder S.H. Enkephalin convertase in the heart: similar disposition to atrial natriuretic factor // Endocrinology. 122, N 6. P. 2683-2691.

68. Maggi C., Manzini S. Tachykmin Receptor Antagonists. // Drugs and the Lung 1994, 507-520.

69. Nawa H. // Nature 1983, Vol. 306, P. 32.

70. Norenberg U., Richter D. Processing of the oxytocin precursor: isolation of an exopeptidase from neurosecretory granules of bovine pituitaries // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1988. 156, N 2. P. 898-904.

71. Rouille Y., Chauvet J., Acher R. Partial conversion of vasopressinyl-Gly-Lys-Arg into pharmacologically active vasopressin through secretory granule carboxypeptidase E and alpha-amidating processing enzymes // Biochem. Int. 1992. 26, N 4. P.739-746.

72. Schnebli H.P., Phillipps M.A., Barclay R.K. Isolation and characterization of an enkephalin-degrading aminopeptidase from rat brain // Biochim. Biophys. Acta. 1979. 569, N 1. P. 89-98.

73. Seidah N.G., Chretien M. Proprotein and prohormone convertases of the subtilisin family - recent developments and future perspectives // Trends Endocrinol. Met. 1992. 3, N 4. P. 133-140.

74. Shimamura M., Hazato T., Iwaguchi T. A new aminopeptidase in monkey cerebral membrane fraction: hydrolysis of enkephalin // Brain Res. – 1988. 445. P. 350-353.

75. Skidgel R.A., Erdos E.G. The broad substrate specificity of human angiotensin I converting enzyme // Clin. Exp. Hypertens. – 1987. A9, N 2/3. 243-259 c.

76. Smyth D.G., Maruthainar K., Darby N.J., Fricker L.D. Catalysis of slow C terminal processing reactions by carboxypeptidase H // J. Neurochem. 1989. 53, N 2. P. 489-493.

77. Steiner D.F. The biosynthesis of biologically active peptides: a perspective // Peptide Biosynthesis and Processing (Fricker L.D., ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991. P. 1-16.

78. Supattapone S., Fricker L.D., Snyder S.H. Purification and characterization of a membrane-bound enkephalin-forming carboxypeptidase, «enkephalin convertase» // Neurochem. 1984. 42, N 4. P. 1017-1023.