

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 06.04.01 Биология

Магистерская программа Биохимия и молекулярная биология

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

**«ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ
СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ»**

Студент  Абрамочкина Надежда Дмитриевна

Научный руководитель  Соловьев В. Б.

Нормоконтролер  Кручинина А.Д.

Рецензент  Боряев Г.И.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 03.06.17 № 13)

Заведующий кафедрой  Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично (протокол заседания ГЭК от 22.06.17 № 1)

Секретарь ГЭК  Кручинина А.Д.

Пенза, 2017

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
Глава 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1.1 Синтетические пептидные препараты.....	7
1.2 Общая характеристика и обмен регуляторных пептидов.....	7
1.2.1 опиоидные пептиды	9
1.2.2 Пептиды мозга и кишечника.....	13
1.2.3 Пептиды нервной системы.....	17
1.2.4 Пептидные гормоны.....	19
1.2.5 Вазоактивные пептиды.....	23
1.2.6 Тахикинины.....	24
1.2.7 Иммуномодулирующие пептиды.....	27
1.2.8 Карбоксипептидаза E.....	27
1.2.9 Фенилметилсульфонилфторид-ингибируемая карбоксипептидаза.....	29
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	31
2.1 материалы и условия проведения исследования.....	31
2.2 методы исследования.....	32
2.2.1 общая схема исследований.....	32
2.2.2 схема введения семакса и селанка.....	32
2.3 методы определения активности протеолитических ферментов.....	33
2.3.1 определение активности карбоксипептидазы E.....	33
2.3.2 определение активности фенилметилсульфонилфторид ингибируемой карбоксипептидазы	34
2.4 методы определения белка.....	35
2.5 методы статистической обработки.....	35
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	36
3.1 Влияние семакса на активность карбоксипептидазы E и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы в отделах головного мозга и надпочечниках крыс.....	36
3.2 Влияние селанка на активность карбоксипептидазы E и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы в отделах головного мозга и надпочечниках крыс.....	44
ВЫВОДЫ.....	53
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	54

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКТГ –	адренокортикотропный гормон
БСА –	бычий сывороточный альбумин
ВИП –	вазоактивный интестинальный пептид
ГЭМЯК –	гуанидиноэтилмеркаптоянтарная кислота
КПЕ –	карбоксипептидаза E
ЛГ –	лютеинизирующий гормон
МСГ –	меланоцитостимулирующие гормоны
ПОМК –	проопиомеланокортин
СТГ –	соматотропный гормон
ФМСФ –	фенилметилсульфонилфторид
ФМСФ-КП –	фенилметилсульфонилфторид-ингибируемая карбоксипептидаза
ФСГ –	фолликулостимулирующий гормон
ЦНС –	центральная нервная система
DBI –	ингибиторы связывания диазепама
DSIP –	дельта-сон индуцирующий пептид
GLP –	глюкагон-подобные пептиды

ВВЕДЕНИЕ

Пептидэргическая система организма является неотъемлемой частью регуляторной системы в целом. Данная система представляет собой огромный класс биологически активных веществ, который включает в себя регуляторные пептиды, регуляторные белки, которые схожи с пептидами и по своему строению, и по функциям, группы ферментов- пептидогидролаз, которые участвуют в их метаболизме, а так же комплекс рецепторов, которые проводят их физиологическое действие. После того, как было установлено, что регуляторные пептиды могут вести себя как гормоны и регуляторы нейромедиаторов, то стало интересно не только как работает данная система, но еще и каковы функции протеолитических ферментов, которые принимают не маловажное участие в обмене регуляторных пептидов.

Как уже известно, работа пептидэргической системы является одним из индикаторов состояния организма в целом. Следовательно, становится возможным и контроль работы данной системы через ферменты, которые регулируют процессинг, а зная о том, что регуляторные пептиды играют немаловажную роль в адаптивных процессах, то возможно, мы сможем помочь организму приспособиться к воздействию стрессовых агентов из вне.

Говоря о том, что система регуляторных пептидов полифункциональна, нельзя забывать и то, что присутствует довольно сложное разделение начальных и последующих эффектов многих представителей этой группы [3, 7, 56, 90], а все потому, что эффект, который демонстрирует какой-либо пептид зависит не только от его строения, но и способа его синтеза, места локализации и его нахождения рядом с другими регуляторными молекулами. Но интересным представляется тот факт, что напрямую и непосредственно повлиять на какой-то отдельный пептид, при этом, не задев всю системы в целом пока не получается.

В данной работе мы хотели рассмотреть влияние синтетических пептидных препаратов на пептидэргическую систему и на отдельные

конкретные ферменты – карбоксипептидазу Е и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемая карбоксипептидазу.

Цель работы: на основании изученных данных по исследованию обменов регуляторных пептидов выяснить и обосновать механизмы действия и воздействие на пептидную систему семакса и селанка. И на ферменты ее процессинга (КПЕ и ФМСФ КП).

Задачи:

1. Изучить механизмы действия пептидэргической системы и ферментов ее процессинга
2. Исследовать изменение активности карбоксипептидазы. Е
3. Исследовать изменение активности фенилметилсульфонилфторид - ингибируемой карбоксипептидазы. Е

Проведенные исследования дадут возможность расширить границы использования таких синтетических пептидных препаратов как семакс и селанк, дадут возможность расширить адаптационные резервы организма и нервной системы.

Магистерская диссертация выполнена на 65 листах, содержит 4 рисунка, 2 таблицы и список литературы из 97 источников на русском и английском языках.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Синтетические пептидные препараты

Главной задачей с момента начала изучения регуляторных пептидов являлась цель возможного их использования в качестве терапевтических агентов. Молекулы соматотропина, окситоцина, инсулина, имеющие активный гормональный эффект и оказывающие комплексное и системное влияние на организм, вошли в список лекарственных препаратов. На данный момент, для того чтобы ввести в практику другие регуляторные пептиды, мы должны разобраться с рядом проблем. Во-первых, из-за полифункциональности большинства регуляторных пептидов, которые имеют свое воздействие на многие системы органов, становится затруднительно их использовать как стимулятор обучения памяти, как и происходит с АКТГ. Во-вторых, затрудняется их пероральный прием, так как большинство регуляторных пептидов расщепляются протеазами ЖКТ, сыворотки крови, что так же не дает их вводить подкожно или внутривенно. В-третьих, при проникновении пептидами через гематоэнцефалический барьер, наблюдается высокий уровень их разрушения. В связи с вышеперечисленными проблемами ученые озадачены поиском молекул, которые будут устойчивы к действию протеаз, иметь направленный спектр биохимической активности.

1.2 общая характеристика и обмен регуляторных пептидов

Обладающие биохимической активностью пептиды были обнаружены у различных биологических видов в эволюционном ряду – от кишечнорастворимых и моллюсков до человека [5, 8, 11, 15, 16, 19]. Несмотря на то, что у регуляторных пептидов нет единой классификации, у них все равно имеется совокупность особых: короткая химическая структура, характерная для олигопептидов [11, 16, 17, 19, 22], она включает в себя от 5 до 52 аминокислотных остатков, которые образуются после

многоступенчатого гидролиза пептидов - предшественников [19, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39], большой обьём физиологического действия [4, 6, 8, 10, 13, 44, 67, 70, 73, 75, 88, 89, 93, 97, 90].

На данном этапе известно, что многие классификации регуляторных пептидов основаны на функционально-структурном подходе [18, 19, 33, 45, 56, 67, 74, 78, 99], хотя имеется явная полифункциональность действия и отсутствие особых закономерностей в строении этих же пептидов. Благодаря вышеупомянутым свойствам, пептиды делятся на следующие группы:

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

После сравнительных исследований можно сделать вывод, что функция практически всех регуляторных пептидов обусловлена участием ЦНС [57, 58, 59, 60, 77, 93, 99]. В регуляции центральных (орфанинов, энкефалинов, динорфинов), нейропептида Y, мозгового натрийуретического пептида, вещества P и сравнительно новых пептидов - орексинов A и B в основном отличаются опиоидные пептиды.

Благодаря последним исследованиям было выявлено, что физическая активность очень влияет на отдельные регуляторные пептиды, но есть работы, выводом которых является то, что может быть и разнонаправленное изменение в концентрации исследуемых пептидов при сходных воздействиях, что может быть связано с разными планами проведения исследований. Полифункциональные свойства исследуемых нейропептидов, проявляющиеся при разных функциональных состояниях, так же могут быть причиной однонаправленных изменений их уровня, тем самым усложняя

определение их биологической роли отдельных участков пептидергической системы.

1.2.1 Опиоидные пептиды

Пептиды данной группы имеют явное сходство с рецепторами опиоидного (морфинного) типа [мю-, дельта-, каппа-, орфано-]. Основным структурным элементом которых является последовательность *Tyr-Gly-Gly-Phe*. Такие соединения имеют большую биологическую активность. Данные соединения обладают рядом биологической активности, и обнаружены они в структурах периферической и центральной нервной системы, сыворотке крови, и в ЖКТ [39, 57, 77]. Образование опиоидных пептидов происходит из общих белковых предшественников, таких проопиомеланокортин, продинорфины и др., а из них, в свою очередь, в результате протеолиза образуется ряд физиологически активных молекул [46]. Многие поведенческие реакции, такие как агрессивное поведение, стимулируя к удовлетворению, половое влечение, адаптивно - стрессорные процессы, лекарственная зависимость, пищевое насыщение, уровень болевого порога и т.д., регулируют именно опиоидные пептиды [46, 75, 93]. Регуляция нейродегенеративных процессов, травматических и ишемических повреждений мозга, регуляция кардиоваскулярной и респираторной активности [83] тоже проходит за счет участия опиоидных пептидов. [16, 78]. Контроль центральных и периферических функций организма осуществляется за счет взаимодействия опиоидных пептидов с другими пептидами, или низкомолекулярными медиаторами

К опиоидным пептидам относятся: энкефалины, эндоморфины, эндорфины, ноцистатин, динорфины, ноцицептин, геморфины, деморфины, нейропептиды FF, AF и SF, дельтофины.

Пептиды оказывают налоксон - ингибируемое морфиноподобное анальгезирующее и седативное воздействие за счет их взаимодействия с четырьмя типами опиоидных рецепторов [1, 19, 57, 75].

1. Энкефалины. К семейству относятся: лейцин - энкефалин, метионин - энкефалин, DTLET, DAMGO [14]. Свойства: состоят из сравнительно коротких пептидов, имеют мощный физиологический эффект - от локального контроля соматических функций, до регуляции поведенческих реакций и участия в большом списке нейродегенеративных патологий [2].

2. Эндорфины α и β . Образуются за счет гидролиза проопиомеланокортина [22]. Приводят к девиантному поведению при алкогольном поведении, задействованы при стрессе и в регуляции циркадных ритмов [35, 78].

3. Динорфины относятся к эндогенным опиоидам. Образуются в результате протеолиза продинорфина, содержащих последовательность Leu-энкефалина. Имеют физиологическое влияние на центральные и периферические ноницептивные процессы [24, 69]. В состав подгруппы входят динорфин А и динорфин В – риморфин

4. Дерморфин и дельторфин – специфичные агонисты μ - (дерморфин) и δ - (дельторфин) опиоидных рецепторов, впервые выделенные из кожи бразильской лягушки *Phyllomedusa sauvagei* [13]. Благодаря проведенным исследованиям было обнаружено, что инъекции пептидов крысам снижают порог эпилептического приступа, оказывают выраженный анальгезирующий эффект, стимулируют выброс β -эндорфина [25, 76].

5. Геморфины – продукты протеолиза гемоглобина, обладают сродством к μ -опиоидным рецепторам [95]. Участвуют в анальгезивной реакции и развитии состояния эйфории после физической работы [23, 49]. Лучше всего изучен представитель этой группы – геморфин-7

6. Эндоморфины – недавно изученная группа опиоидных пептидов, впервые обнаруженных в мозге быка. После проведенных работ был сделан вывод, что они проявляют наивысшую специфичность к μ -опиатным

рецепторам по сравнению со всей группой опиоидных пептидов. Вызывают сильную и длительную анальгезивную реакцию [98]. К группе относятся тетрапептиды эндоморфин-1 и эндоморфин-2 [55].

7. β -казаморфин -продукт гидролиза казеина. Во время опытов было замечено, что β -казаморфин показывает высокое сродство к μ -опиоидным рецепторам, обладает выраженной иммуностимулирующей активностью, стимулирует потребление пищи животными [28, 49].

8. Пептиды с антиопиоидной активностью. За счет стимуляции выброса АКТГ и кортикостерона, вещества этой группы усиливают болевой ответ, состояние беспокойства, ингибируют морфин-индуцируемые эффекты – препятствуют проявлению антиноцицептивных свойств морфина, стимулируют развитие зависимости от морфина и алкоголя; влияют на синдром отмены у морфин - зависимых [18, 77]. К группе относятся: нейропептид FF, действует через рецепторы спинальной и супраспинальной зон мозга, обогащенных эндогенными опиоидами [33, 48, 76], ноцицептин – орфанин FQ, производящиеся в дорзальных рогах спинного мозга и влияющий на орфано-опиоидные рецепторы [56, 58, 79, 99], нейропептиды AF.

В 1970-е гг. были найдены специфические мишени морфина в организме - опиоидные (опиатные) рецепторы. Три выделяемых в настоящее время основных типа опиоидных мест связывания называются μ -, δ - и κ -рецепторами. Все три типа опиоидных рецепторов относятся к семидоменным рецепторам, связанным с G-белками, 1 и гомологичны друг другу. В некоторых классификациях рецептор ноцицептина ORL₁ также причисляют к группе опиоидных рецепторов в связи со структурным сходством, но большинство исследователей рассматривают его отдельно, поскольку он не связывает опиоидные лиганды [44].

Ранее указывалось также на существование и опиоидных рецепторов. Однако наличие самостоятельного гена ϵ -рецепторов не подтверждено, что позволяет считать их модификацией μ -, δ - или κ -рецепторов (сопряженных с

разновидностью G-белков) [50]. В то же время μ -рецепторы были позднее выделены в отдельное семейство (кроме опиоидных препаратов они могут связывать и многие другие лиганды) [77]. Большинство опиоидных лигандов способно связываться со всеми тремя типами рецепторов, но с разной аффинностью. Опиоидные рецепторы присутствуют не только в головном и спинном мозге. Они обнаруживаются на нейронах периферической нервной системы, на клетках гладкой мускулатуры внутренних органов [19], а также на поверхности иммунных клеток [18, 54]. Более подробно анатомическое распределение опиоидных рецепторов рассмотрено ниже; все их типы являются потенциальными мишенями не только для болеутоляющих препаратов, но и для антидепрессантов, анксиолитиков и лекарств, снимающих наркотическую зависимость.

Основная функция опиоидных рецепторов связана с пресинаптическим торможением передачи сигнала в различных нейромедиаторных системах. При активации эти рецепторы ингибируют выброс медиаторов разных классов: глутамата и ГАМК [49], моноаминов [48, 67, 85], ацетилхолина [42], вещества P [89]. Сигнал опиоидных рецепторов передается в клетку с помощью G- и Go-белков; каскад внутриклеточной передачи сигнала включает ингибирование аденилат-циклазы, открытие калиевых каналов и закрытие кальциевых каналов на мембране клетки, что вызывает гиперполяризацию мембраны и снижение возбудимости нейрона [32, 70]. Действие опиоидных препаратов на гладкую мускулатуру несколько сложнее.

Прямое влияние этих препаратов на гладкомышечные клетки, как правило, оказывается констрикторным, причем вторичным мессенджером служит инозитолтрифосфат [19]. Этот эффект противоположен расслабляющему действию опиоидных агонистов на гладкую мускулатуру в изолированных органах, опосредованному нейронами [64], а в случае сосудов -эндотелием [80].

1.2.2 Пептиды мозга и кишечника

Данная группа пептидов располагается как в структурах мозга, и надпочечниках, так и в тканях ЖКТ. Взаимодействуя с норадреналин-, серотанин-, и холинэргическими системами, обладают широким профилем физиологической активности. [47, 56].

1. Подгруппа галанина. Галанин и его рецепторы сосредоточены в ЦНС, а в частности в гипоталамусе, преоптической зоне, аркуантном и супраоптическом ядрах. Галанин частично приостанавливает секрецию инсулина и желудочного сока. Нейрональная активность Галанина, локализованного с ацетилхолином, участвует в процессах фиксации памяти и развитии болезни Альцгеймера [36, 58, 79]. Образуется пептид в клетках гипоталамуса, он стимулирует секрецию ЛГ из гипофиза и играет не мало важную роль в регуляции обратной связи гипофизарно-гонадной системы [39, 56].

Галанин, взаимодействуя с вазопрессином и окситоцином, находящимися в супраоптическом и паравентрикулярном ядрах, участвует в осмотической регуляции [77]. Важную роль в регуляторной функции галанина в гипоталамусе играет его ингибиторная активность в отношении глутамат-секреторной и электрической активности аркуатного ядра.

Препараты на основе полусинтетических антагонистов галанина используются терапией в эндокринологии, психиатрии и неврологии. Галанин₁₋₁₃-брадикинин₂₋₉ – антагонист галанина; показывает высокую избирательность и сродство по отношению к сайтам связывания с галанином. Применяется для исследования функциональных последствий блокады галаниновых рецепторов в процессах пространственного обучения. Галанин₁₋₁₃-нейропептид Y₂₅₋₃₆ и Галанин₁₋₁₃-вещество P₅₋₁₁ являются высокоэффективными антагонистами для галаниновых рецепторов и обратимо ингибируют нейрональную активность галанина.

2. Холецистокинин – является важнейшим регулятором функций ЦНС- контролирует эмоциональное состояние, обладает антидепрессантным действием, влияет на пищевобывательное поведение, участвует в патогенезе шизофрении [28,37]. Так же играет не мало важную роль в регуляции функций ЖКТ- стимулирует секрецию поджелудочной железы, участвует в моторике кишечника и сокращении стенок желчного пузыря. Сульфатированный октапептид холецистокинин-8 локализован в основном в структурах мозга и крови, клетках иммунной системы. После введения данного пептида наблюдается снижение антиноцицептивных спинальных эффектов морфина и энкефалина, а также агонистов α_2 -адренорецепторов. Сходным образом действует фрагмент холецистокинин-4 [37, 79].

3. ВИП изначально был найден в структуре тонкой кишки свиньи, затем был обнаружен во многих отделах нервной системы. Участвует в бронхо- и вазодилатации, сопутствующий медиатор в серотонинергической и холинергической системах. Участвует в стимуляции процессов обучения и памяти, регулирует поведенческие реакции [33, 56]. Структурный гибрид нейротензина₆₋₁₁ и VIP₇₋₂₈ является антагонистом ВИП для большинства физиологических эффектов.

4. Жрелин – был открыт относительно недавно. Выделен из клеток пищевода. Участвует в патофизиологических процессах, связанных с ожирением, усиливает действие СТГ, синтезируется в эндокринных клетках ЖКТ, гипоталамусе. Если уровень пептида в крови выше нормы, это может свидетельствовать о начале патологических изменений. Так же может наблюдаться и корреляция с массой тела, уровнем лептина и инсулина в сыворотке [15, 28, 43]. Способствуя снижению артериального давления, жерлин угнетает активность нейронов симпатической нервной системы. [54,80].

5. Гастролиберин – пептид, продуцирующийся некоторыми линиями опухолевых клеток, для которых обладает митогенной активностью [47,56,64]. Был выделен из мозга и ЖКТ млекопитающих. Участвует в

центральном компенсаторном механизме ограничения пищевой мотивации и стимуляции синтеза инсулина [22, 83]. Способствует совмещению процессов памяти, участвует в протекании стресс-реакции [38,79].

6. GLP – являются продуктами ограниченного протеолиза препроглюкагона субтилизин-подобными конвертазами, в результате чего образуются глюкагон или GLP. Выделяются из энтероэндокринных клеток кишечника, выявлена экспрессия в нейронах аркуатного ядра мозга и в ядре солитарного тракта [39,44,56,78]. Пептиды участвуют в стимуляции пролиферации клеток панкреатических островков и глюкозозависимую секрецию инсулина. Так же задействованы в центральной регуляции энергетического гомеостаза и потребления пищи. Известно, что GLP-1 и GLP-2 участвуют в регуляции нейрональной пластичности при нейродегенеративных патологиях, стрессе, так же возможно его участие в процессах обучения и памяти [54, 69, 76]. Уже известно о значительной роли продуктов протеолиза GLP-1 и GLP-2 в контроле сердечно-сосудистой деятельности и уровня артериального давления[141, 144, 145], регуляции функций высшей нервной системы

7. Нейротензин Локализован в нейронах мезокортиколимбической и нигростриатной зон вместе с дофамином. Обнаружен ретроградный аксональный транспорт нейротензина в дофаминергических нейронах [32], известна колокализация нейротензина и прогестерона в ядрах вентролатерального гипоталамуса, которая непосредственно связана с регуляцией полового поведения [68]. Нейротензин непосредственно связан с центральной регуляцией поведенческих и соматических реакций организма, отвечает за ноницептивные процессы, принимает участие в развитии стресс - реакции [77, 88, 96].

8. Нейропептид Y относится к представителям панкреатических пептидов, был описан в 1982 г. Обнаружен в гипоталамической и кортикальной областях мозга, ведет себя как нейротрансмиттер и сопутствующий медиатор, колокализован с другими химическими

регуляторами. Известно распространение пептида в нейронах префронтальной коры и изменение его уровня в нейронных популяциях в онтогенезе и при проявлении патологических изменений в организме [67, 68]. Уже известно о распределении пептида в нейронах префронтальной коры и варьирования его уровня. Колокализован В надпочечниках совместно с VIP и норадреналином. Так же известно, что нейропептид участвует в модуляции центральных кардиоваскулярных ответов, Влияет на высвобождение гипофизарных гормонов. Замечено, что пептид участвует в контроле циркадных ритмов, болевого ответа, мотивационного поведения [99]. Участки нейропептида Y могут служить агонистами и антагонистами его рецепторов. Пептид YY человека, выделенный из экстракта прямой кишки, структурно схож с нейропептидом Y и конкурирует с ним за связывание с рецепторами [97].

9. Секретин– пептид, выделяющийся в мозге, надпочечниках, кишечнике [66]. Главная биологическая роль заключается в расслаблении гладкой мускулатуры, стимулированием выделение гормонов поджелудочной железы, и локализована в основном в ЖКТ [99]. Предполагается участие в регуляции функций центральной нервной системы [55, 57].

1.2.3 Пептиды нервной системы

Пептиды, синтезируемые в центральной нервной системе и периферической гомологично схожи с предыдущей группой пептидов. Функционируют как нейромодуляторы и нейромедиаторы, оказывая влияние практически на все процессы нервной деятельности. Так же замечено, что пептиды данной группы участвуют в контроле сердечно-сосудистой деятельности и артериального давления..

1. Орексины – недавно рассмотренная группа гипоталамических пептидов, синтезируемых из высокомолекулярного предшественника. К группе принадлежат орексин А, взаимодействующие с двумя типами рецепторов (OXR_1 и OXR_2). Известно, что локализация данных пептидов приходится на структуры дорзального и переднего гипоталамуса, в волокнах супрахиазматического и других ядер [57]. Данная группа пептидов участвует в контроле потребления пищи, регуляции цикла сон-бодрствование и стресс-реакций [41, 75].

2. DBI и октадеканейропептид пептиды, противодействующие ГАМК-рецепторам. Большое их количество разбросано в нервной системе, вся их функция обусловлена блокировкой действия медиатора ГАМК. Пептиды выполняют не маловажную роль при стрессе, так же задействованы в патогенезе тревожных состояний [77].

3. Кортистатин структурно очень схож с гормоном-соматостатином, но выделяется другим геном [63]. Под действием кортистатина замедляется нейрональная электрическая активность, но при этом возникают медленные волны в коре больших полушарий; имеет противоположный эффект к ацетилхолину при процессах возбуждения в коре и гиппокампе. контролирует циклы сон-бодрствование [19].

4. Нейротрофический пептид поврежденного мозга был выделен из мозга крысы благодаря экспериментальной травме. Стимулирует

поддержание деятельности холинергических нейронов перегородки и дофаминергических нейронов мезэнцефалона в первичной культуре неонатального мозга. Препятствует прониканию в клетку экзайтотоксичности глутамата [93].

5. Секретонейрин – пептид образуется за счет протеолиза нейроспецифического белка секретогранина, который собирается в больших количествах в нейронах. Секретонейрин может рассматриваться как нейрональный маркер болезни Альцгеймера, за счет накопления его в больших количествах в амилоидных бляшках, при этом снижая свою концентрацию в остальных структурах [99]. Но так же, и при других повреждениях нервной системы, происходит снижение концентрации [90].

6. Пептид, активизирующий аденилатциклазу гипофиза структурно схож с ВИП, впервые был выделен из гипоталамуса овцы. Регулируя уровень артериального давления и осмотического давления клеток, пептид моделирует действия вазопрессина и окситоцина, участвует в контроле работы мозжечка при физической активности [92, 95].

7. Ген-кальцитониновый пептид на данный момент, известно об его экспрессии во многих тканях и органах, но впервые был выделен из опухоли тиреоидной ткани человека. При альтернативном сплайсинге мРНК, синтезируется из того же гена, что и кальцитонин [93]. Расслабляет гладкую мускулатуру, влияя тем самым на пищевое поведение, играет не маловажную роль в поддержании тонуса коронарных сосудов, контролирует активность болевой чувствительности [96].

8. Кисспептины – пептиды были изначально выделены из меланомных клеток [98], сейчас данную группу пептидов рассматривают, как систему, контролирующую выделение люлиберина и гонадотропных гормонов гипофиза [98]. Благодаря последним исследованиям стало известно, что кисспептины входят в состав системы обратной связи между половыми стероидами и люлиберин-продуцирующими нейронами гипоталамуса [99]. Данная группа пептидов действует через рецептор GPR54, участвующий

также в подавлении метастазной активности многих опухолей. Кисспептины играют не маловажную роль в контроле полового поведения, участвуют в регуляции гонадотропной оси [99] и влияют на пищевую мотивацию.

9. DSIP – был выделен из ядер таламической области кроликов. Физиологических функций у данного пептида множество: влияет на циркадные ритмы, участвует в контроле циклов сна- бодрствования, обладает стресс-протективным действием, определяет налксон-зависимую анальгезию, контролирует содержание медиаторов, понижает порог судорожной активности, влияет на концентрацию медиаторов и нейропептидов в мозге. После введения в мозг данного пептида наблюдается понижение активности моноаминоксидазы и следовательно, связанный с этим порог кататонической реактивности. DSIP повышает секрецию СТГ из гипофиза, люлиберина и соматостатина из гипоталамуса, а так же понижает синтез кортиколиберина [31].

1.2.4 Пептидные гормоны

Пептиды данной группы продуцируются железами внутренней секреции и выполняют множество гормональных функций. Представляют собой полипептид длиной до 50 аминокислотных остатков. Пептиды отвечают за регуляцию системных физиологических процессов, но так же есть информация о том, что они могут принимать участие в контроле отдельных функций в структурах нервной системы..

1. АКТГ– входит в состав компонентов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, при этом является одним из важнейших ее составляющих. Производится преимущественно в средней и передней доле гипофиза из предшественника ПОМК. В кровоток попадает при сопутствующем влиянии кортиколиберина[97]. Основной функцией является стимуляция выброса гормонов из надпочечников[98]. Так же имеет широкое воздействие на деятельность ЦНС. АКТГ и его фрагменты имеют массу

физиологических функций: влияют на поведенческие реакции, память, мотивацию и процессы обучения. Когда происходит дисбаланс системы АКТГ, происходят серьезные нейрпатологии : алкоголизм, болезнь Альцгеймера и т.д. [99].

2. Кортиколиберин продуцируется в передней доле гипофиза и в гипоталамусе. Кортиколиберин-секретирующие клетки найдены в надпочечниках, желудочно-кишечной системе, в печени, поджелудочной железе, в плаценте, в клетках эндокринных опухолей в легких. Пептид контролирует выработку АКТГ и β -эндорфина; активно участвует в деятельности нервной, эндокринной, репродуктивной, сердечно-сосудистой, иммунной системах [85, 89, 98].

3. Люлиберин – гормон, образующийся в мозге, гонадах, плаценте и гипоталамусе. Провоцирует выделение ФСГ и ЛГ из передней доли гипофиза. Выполняет важную роль в функционировании репродуктивного поведения.

4. Соматостатин с самого начала был найден в гипоталамусе, и работал как ингибитор секреции СТГ. Затем, стало известно о его распределении в коре больших полушарий желудочно-кишечной системе [99]. Соматостатин-14 и соматостатин-28 – важнейшие физиологически активные формы данного пептида. Функции соматостатина: подавление высвобождения тиротропина и кортикотропина из гипофиза, угнетение секреции глюкагона и инсулина, коррелирует с веществом Р как в мозге, так и на периферии [99]. Важным компонентом развития эпилептогенных судорог у крыс можно считать нейроны гиппокампа, синтезирующие соматостатин.

5. Группа пептидов МСГ образуется из проопиомеланокортина в средней доле гипофиза и в других отделах мозга. Одна из форм, α -МСГ, участвует в процессах памяти и обучения, стимулирует пигментацию кожи, обладает психотропной активностью, стимулирует агрессивное поведение [41, 92]. Другая форма – γ -МСГ – стимулирует стероидогенную функцию АКТГ, имеет слабую меланотропную активность [51]. Функции данных пептидов:

могут быть задействованы в регуляции гемодинамики, работе ЖКК, поведенческих и иммунных реакциях, участвуют в клеточном росте, в регуляции пищевой мотивации [40, 41]. α -МСГ показывает воспалительные реакции в мозге; угнетает синтез клетками глии фактора некроза опухоли и NO [93].

6. Окситоцин- циклический пептид, где Cys₁-Cys₆ соединены дисульфидным мостиком. Синтезируется окситоцин в гипоталамусе. Гормоны из задней доли гипофиза высвобождаются в кровь, предварительно попав туда по гипоталамо-гипофизарному пути. Окситоцин активно участвует в протекании беременности, процессе родовой деятельности и при лактации: стимулирует сокращение матки и миоэпителиальных клеток молочной железы, выделение пролактина [92]. Деятельность окситоцина непосредственно связана с ГАМКерической, адренергической системами, системой эндогенных опиоидов и продуцируется действием нейротрофических и ростовых факторов мозга [83].

7. Вазопрессин – остатки Cys₁-Cys₆ соединены дисульфидной связью— пептид функционально и структурно схож с окситоцином, но имеет отличие в физиологических действиях. В работе ЦНС вазопрессин участвует в регуляции гемодинамики, мотивации алкогольного поведения, терморегуляции, агрессивного поведения, при процессах обучения и памяти [73]. Так же гормон обладает сильным вазоконстрикторным действием [96] и контролирует водно-электронный обмен.

8. Тиролиберин локализован в гипоталамусе и в малых концентрациях найден в гастроинтестинальной системе. Стимулирование секреции тиротропина из передней доли гипофиза является основной функцией гормона. Так же пептид задействован в релизинге вазопрессина, пролактина, кортикотропина, соматостатина и ростового гормона [99].

9. Лептин— выделяется адипоцитами. Совершенно недавно открытый пептидный гормон. Совместно с инсулином и глюкагоном, непосредственно задействован в пищевой мотивации, потреблении пищи и энергетическом

обмене [69]. Лептин продуцируется в гиппокампе, мозжечке, коре , базальных ганглиях и стволе головного мозга. Там же пептид и проявляет протективный и нейромодулирующий эффект [99]. В зависимости от уровня концентрации лептина в крови по-разному осуществляется обратная связь с мозгом, поддерживается энергетический баланс и контроль веса тела. Действие лептина непосредственно связано с участием гипоталамического нейропептида Y, снижающего уровень лептина.

10. Урокортин– структурно схож с кортиколиберином, и с его же рецепторами урокортин взаимодействует в ЦНС . Функции: формирует пищевое поведение, контролирует деятельность сердечно-сосудистой системы , задействован в стресс-реакциях, и работе ЖКТ[96].

Особенности белково-пептидных гормонов:

1. Образование из прогормонов путем ограниченного протеолиза. Этот процесс может быть однократным (кинины), двукратным (инсулин, ангиотензин II) или многократным (образование из белка проопиомеланокортина опиоидов, меланокортинов и липотропинов). Иногда ограниченный протеолиз происходит не в синтезирующих клетках, а в плазме крови (кинины, ангиотензин).
2. Образование в большинстве (или даже во всех) клетках организма и в плазме крови.
3. Возможность образования одного и того же гормона в разных клетках. Ряд идентичных пептидов синтезируется в мозге и ЖКТ. Например, соматостатин из гипоталамуса переносится в гипофиз и тормозит образование СТГ. Но тот же соматостатин, образованный в дельта-клетках поджелудочной железы, тормозит образование ГГ, ИН и даже экзогенных секретов. Этот гормон может образовываться в плаценте, тканях плода, клетках половых органов, в воспалительных и иммунных клетках, в этих же клетках образуются СТГ, ИФР-1, лептин. Холецистокинин увеличивает секрецию поджелудочного сока и

сокращает желчный пузырь, открывая проток железы, а в головном мозге он выполняет совершенно другие функции: ингибирует пищедобывательное поведение, является одним из факторов, определяющих состояние тревожности и страха. Как ни странно, такие разные системы как головной мозг и желудочно-кишечный тракт имеют много общих гормонов, а функции они выполняют разные, т.е. гормоны становятся «многостаночными».

4. Действие через рецепторы плазматической мембраны и системы вторых посредников и/или протеинкиназ и тирозинкиназ

1.2.5 Вазоактивные пептиды

Основной функцией данной группы пептидов является регуляция функционального состояния сердечнососудистой системы, артериального давления и водно-минерального обмена[16]. Синтезируются в отделах нервной системы и тканях организма.

1. Ангиотензины – одни из важнейших представителей пептидов данной группы. Найдены практически во всех тканях организма , а так же в структурах ЦНС. Главный эффекторный пептид – ангиотензин II синтезируется из предшественников под действием ренина и [16].

2. Адреномедуллин – впервые был выделен из клеток феохромоцитомы человека, в 1993 году [93]. Блокируя базальную секрецию АКТГ, вызывает сильный гипотензивный эффект в клетках гипофиза. Играет не маловажную роль при патогенезе сердечнососудистых заболеваний, при травматических и ишемических патологиях мозга. Аутокринный регулятор функций гематоэнцефалического барьера.

3. Кинины –пептиды, экспрессирующиеся во многих тканях и органах, и в ЦНС[769]. Обладают большим спектром физиологической активности. Пептиды данной группы являются связующим звеном системами регуляции сосудистого тонуса , и образуются они за счет действия калликреинов. Брамикинин - основной физиологический пептид данной группы. Без

брадикардина не возможна регуляция гомеостаза, водного и электролитического балансов, местных воспалительных реакций, вазодилатации и проницаемости капиллярной системы[48].

4. пептиды натрийуретической группы. Оказывают воздействие на секрецию многих вазоактивных пептидов[67, 88]. Обнаружены в клетках мозга и сыворотке крови. Основные представители группы – атриальный натрийуретический пептид (соединены дисульфидной связью), натрийуретический пептид мозга (соединены дисульфидной связью) и натрийуретический пептид

5. Эндотелины – пептиды, открытые в 1988 г. Синтезируются в эндотелиальных клетках сосудов, имеют сильное вазоконстрикторное действие. Экспрессия пептидов этой группы показана в нервной ткани [98]. Эндотелины воздействуют в основном через 4 типа рецепторов, локализованных в эндотелии, гладкой мускулатуре и нервной ткани. Основным физиологически активный пептид эндотелин-1 и его гомологи эндотелин-2 и эндотелин-3

1.2.6 Тахикинины

К данной группе пептидов относятся вещества, имеющие сходную С-концевую последовательность и общего предшественника β -препротахикинина, они довольно широко встречаются в тканях организма и отличаются высокой биологической активностью. Важнейшие функции: регуляция гладкой мускулатуры кишечника, бронхов, участвуют в контроле поведенческих реакций. Сейчас известно 3 типа рецепторов (NK1, NK2, NK3) и множество подтипов.

Тахикинины являются семейством пептидов, которые содержат общую для них последовательность с амидированной концевой карбоксильной группой, Phe-Xaa-Gly-Leu-Met-NH₂, которая далее обозначается как Последовательность с номером идентификации[67, 70, 76]. Первым выделенным пептидом из этого семейства было вещество Р, однако

получение его в чистом виде и установление его первичной структуры было осуществлено лишь в начале 1970 г.

Вещество Р имеет следующую аминокислотную последовательность Aro-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Pne-Gly-Leu-Met-NH₂ которая далее обозначается как Последовательность с номером идентификации.

Между 1983 и 1984 годами несколько групп исследователей сообщили о выделении двух новых тахикининов млекопитающих, которые получили в настоящее время название нейрокинин А (известно так же как вещество К, нейромедин I и нейрокинин^α) и нейрокинин В (известно так же как нейромедин К и нейрокинин^β) [33, 77, 90]. Нейрокинин А имеет следующую последовательность аминокислот His-Lys-Thr-Asp-Ser-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂, которая далее обозначается как Последовательность с номером идентификации. Структура нейрокинина В описывается следующей последовательностью аминокислот Asp-Met-His-Asp-Phe-Phe-Val-Gly-Leu-Met-NH₂, которая далее обозначается как Последовательность с номером идентификации[48,66, 79].

Тахикинины входят в состав как центральной, так и периферической нервной системы, выделяются из нервов и обладают широким спектром биологических воздействий, которые в большинстве случаев определяются активностью специфических рецепторов, располагающихся на мембранах клеток-мишеней. Тахикинины выделяются также рядом нелевальных тканей.

Тахикинины млекопитающих, такие как вещество Р, нейрокинин А и нейрокинин В осуществляют свое действие посредством трех основных рецепторных подтипов, которые обозначают соответственно как NK-1, NK-2 и NK-3. Указанные рецепторы присутствуют во многих органах.

1. Вещество Р – практически самый известный регуляторный пептид. Открыт в 1931 году. На данный момент известна экспрессия трех предшественников пептида – α-, β- и γ-препротахикининов. Локализован в

основном ЦНС [99]. Функции: регуляция артериального давления, сокращение гладкой мускулатуры, контроль капиллярной проницаемости, секретогенное действие, регуляция высвобождения пролактина и пищеварительных гормонов [99].

2. Бомбезин—впервые выделен из лягушки, представитель тахикинонов явно проявляет соматические эффекты: воздействует на секрецию ЖКТ, вызывает вазоконстрикцию, задействован в терморегуляции .

3. Нейромедины/нейрокинины – пептиды, широко экспрессирующиеся во многих тканях и органах, впервые выделены из спинного мозга. Схожи в строении с веществом Р, но отличаются от него по локализации в ЦНС и взаимодействием с рецепторами [99]. Функции: регулируют уровень артериального давления, влияют на сокращение гладкой мускулатуры, задействованы в передаче нервных импульсов как нейромодуляторы . Известные представители: нейромедин N, нейрокинин А и нейрокинин В.

1.2.7 Иммуномодулирующие пептиды

Главной функцией данной группы пептидов является стимуляция антителпродуцентов, активация макрофагов.

1. Тафтсин—данный пептид впервые был охарактеризован как фактор стимуляции фагоцитоза нейтрофилов. Но на данный момент известно, что пептид включает противомикробную, противовирусную и противоопухолевую активность [47].

2. Подгруппа миелопептидов. Выделена из костного мозга человека, включает в себя шесть пептидов: МП-1 и МП-6, имеющих, по-видимому, разное происхождение. Аминокислотная последовательность МП-1 и МП-2 схожа с данной у консервативных фрагментов α -(33-38) и β -(31-36) цепей гемоглобина человека, для остальных пептидов структурных аналогов не найдено [99]. Функции: иммунокорректирующая, противоопухолевая, участвуют в процессах клеточной дифференцировки [35, 36].

1.2.8 Карбоксипептидаза Е

Карбоксипептидаза Е (КПЕ, карбоксипептидаза Н, энкефалинконвертаза, КФ 3.4.17.10) была выделена из мозга, гипофиза и хромоаффинных гранул надпочечников. Сейчас известно, что синтезируется КПЕ во многих тканях и органах, но ее содержание в них может различаться во много раз, и зависит от концентрации физиологически активных пептидов. [99]. В живой клетке она находится в двух формах: растворимой с M_r 53-57 кДа и мембрансвязанной с M_r 55-57 кДа. Каждая из них одноцепочечный гликопротеин и происходят из одного. Отличие мембрансвязанной формы от С-концевой в аминокислотной последовательности из 21 аминокислот.

Мембрансвязанная форма КПЕ возможно связана с эндоплазматическим ретикулулом и элементами комплекса Гольджи, а растворимая форма, в свою очередь, связана с секреторными везикулами. так же встречается и совместная локализация КПЕ растворимого с биологически

активными пептидами (глюкагон, инсулин, АКТГ, энкефалины, окситоцин и т.д.) [94].

Фермент очень специфичен, что является его явной особенностью. Специфичность фермента проявляется ко всем пептидам с С-концевым остатком, являющимися субстратом.. КПЕ отщепляет остатки лизина и аргинина от Arg⁸-вазопрессин-Gly-Lys-Arg, а также превращает ¹²⁵I-Met-энкефалин-Arg⁶ и ¹²⁵I-Met-энкефалин-Lys⁶ в ¹²⁵I-Met-энкефалин. Фермент удаляет остатки -Lys¹⁵-Lys¹⁶-Arg¹⁷ с карбоксильного конца фрагмента АКТГ (АКТГ₁₋₁₄) и остатки аргинина с С-конца гиппурил-L-Arg и Leu-энкефалин-Arg [99].

В активном центре КПЕ находится Zn²⁺ , что говорит о том, она является тиолазависимым металлоферментом . Фермент имеет оптимум pH 5,5-6,0, активируется ионами Co²⁺ в 5-10 раз, ионами Ni²⁺ в 2-3 раза, ингибируется CuCl₂, HgCl₂, ПХМФС, аминопропилмеркаптоянтарной кислотой, 2-меркаптометил-3-гуанидилэтилтиопропановой кислотой, ЭДТА и 1,10-фенантролином. Сульфат цинка, хлорид кальция, N-этилмалеимид и ФМСФ не влияют на активность КПЕ [98, 99]. В ответ на раздражители из вне, уровень мРНК КПЕ может быстро изменяться [8]. Фермент вовлекается в процессинг многих биологически активных пептидов, об этом говорят его физико-химические свойства, тканевая, субклеточная и клеточная локализация, субстратная специфичность. В ответ на фармакологические воздействия на культуры клеток и организм в целом , изменяется активность КПЕ.. Функции: участвует в регуляции развития в онтогенезе [14], играет немаловажную роль при половом созревании [38] и т. д..

1.2.9 Фенилметилсульфонилфторид-ингибируемая карбоксипептидаза

Первые сведения о существовании фермента относятся к 1993 году [43], он отщепляет остатки основных аминокислот с карбоксильного конца синтетических пептидов, однако отличается от всех известных металлокарбоксипептидаз,. Более подробные появились в 1995 году [8, 11, 14].

ФМСФ-КП отщепляет аргинин и лизин с С-конца пептидов. Фермент имеет M_r 100-110 кДа и проявляет максимальную активность при pH 6,0-6,5 [11]. 1 мМ ФМСФ и ПХМБ полностью ингибируют фермент, иодоацетамид подавляет активность на 40%. ФМСФ-КП схожа по физико-химическим свойствам с лизосомальной карбоксипептидазой А (КПА, катепсин А, КФ 3.4.16.1), но отличается специфичностью к субстрату и распределением активности в тканях и отделах мозга [15, 98].

Высокая эффективность данного фермента обнаружена в надпочечниках. В гипофизе, семенниках, почках, легких, селезенке, в отделах головного мозга и печени – активность немного ниже.. важным является тот факт, что надпочечниках, где синтезируется большое число энкефалинов, активность ФМСФ-КП в 8 – 9 раз выше, чем активность КПЕ. Кроме того, сродство ФМСФ-КП к дансил-Phe-Leu-Arg значительно выше, чем сродство КПЕ [21]. Возможно, что наиболее предпочтительными эндогенными субстратами для ФМСФ-КП являются проэнкефалины (энкефалин- Leu⁵(Met⁵)-Arg⁶).

Благодаря данным, которые имеются на сегодняшний день, можно сделать вывод о возможном участии ФМСФ-КП в процессинге предшественников ряда нейропептидов, а также в деградации их активных форм [8, 15, 38, 39]. Так же известно, что фермент вовлечен в регуляцию онтогенеза [8, 14], половых функций [8, 38, 39], адаптации к стрессу [15]. Из всего вышесказанного можно сделать вывод, что ФМСФ-КП является

ферментом с широким спектром физиологической активности, но в отличие от других ферментов обмена регуляторных пептидов, его биологическая роль изучена недостаточно хорошо.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материал и условия проведения исследований

Исследования проводились на цельной крови и сыворотке крови человека (мужчины в возрасте 18-28 лет) и на мозге самцов белых беспородных крыс. Изначально, крысы находились в условиях вивария с обычным рационом питания. Обследование грызунов проводили на протяжении двух недель до исследования. Для чистоты исследования были набраны контрольная и опытная группы из одинаковых по весу (200-250 грамм) и по возрасту (6 месяцев) животных. Каждая серия экспериментов, включая контроль, проводились в течение 3 дней и в строго одинаковых, стандартных условиях: условия приготовления ферментных препаратов, время забоя, температура и др. В каждой из этих серий исследований было задействовано не менее 7 особей.

Над животными проводилась эвтаназия под хлороформом. Затем декапировали голову и извлекали мозг, тушку вскрывали и доставали надпочечники. Выбранные части сразу же помещали в охлажденный (0-4° С) раствор 0,25 М сахарозы. Из головного мозга выделяли гипоталамус, гипофиз, стриатум и мозжечок. Исследуемый материал замораживали и хранили при -40° С для дальнейшего анализа.

У добровольцев-мужчин производили забор крови из локтевой вены. С помощью центрифугирования при 4000g 10 мин, 4°С получали сыворотку крови, замораживали и хранили при -40° С. Сыворотку размораживали непосредственно перед исследованием нагреванием до 4° С, пропусканием материала через колонку с сефадексом G-25, сыворотку отчищали от низкомолекулярных нингидринположительных компонентов, после чего ее разводили физиологическим раствором 1:1.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Общая схема исследования

Определение активности КПЕ и ФМСФ-КП проходило в нервной системе беспородных белых крыс. Они были разделены на следующие группы:

1. интактная группа , n=7
2. контрольная группа, в которой крысам интраназально вводилась дистиллированная вода, и декапитация проводилась через 0,5 (n=7), 4 (n=7) и 24 ч (n=7) после инстилляций;
3. I экспериментальная группа, в которой проводилось итраназальное введение семакса и затем декапитация через 0,5 (n=7), 4 (n=7) и 24 ч (n=7) после инстилляций;
4. II экспериментальная группа, в которой проводилось интраназальное введение селанка и затем декапитация через 0,5 (n=7), 4 (n=7) и 24 ч (n=7) после инстилляций;

2.2.2 Схема введения семакса и селанка

Введение пептидов проводилось интраназально (1 % раствора в дозе 300 мкг/кг). Итоговый вводимый объем был равен 6 мкл. Животным контрольной группы вводили такой же объем дистиллированной воды. Спустя 0.5, 4 и 24 часа после введения веществ контрольной и опытной группе проводили декапитацию для дальнейшего изучения активности ферментов обмена регуляторных пептидов.

2.3 Методы определения активности протеолитических ферментов

2.3.1 Определение активности карбоксипептидазы E

КПЕ представляет собой одноцепочечную пептидазу с оптимальным диапазоном pH от 5,0 до 6,0. Это цинк-металлокарбоксипептидаза, которая удаляет основные аминокислоты из С-конца пептидов. Подобно другим металлокарбоксипептидазам, его активность сильно стимулируется миллимолярными концентрациями Co^{2+} , в меньшей степени – ионами Ni^{2+} . Ингибиторами являются ионы Cd^{2+} и Cu^{2+} , хелатирующие агенты (ЭДТА, о-фенантролин). Активность фермента после данных ингибиторов восстанавливается при добавлении ионов Zn^{2+} .

С помощью метода Fricker и Snyder [99] определяли активность КПЕ. Механизм определения активности в опытной пробе : 55 мкл гомогената вводили в 155 мкл дистиллированной воды.

Механизм определения активности в контрольной пробе: 50 мМ натрий-ацетатного буфера, pH 5,5, с 51 мМ NaCl или к смеси 144 мкл вышеуказанного буфера и 10 мкл 26 мкМ водного раствора ингибитора ГЭМЯК.

Затем пробы выдержали при 36° С 7 минут. Опыт начинали добавлением 52 мкл заранее подогретого до 35° С 215 мкМ раствора дансил-фен-ала-арг, выверенного на воде (финальное содержание в реакционной смеси 45 мкМ). Далее пробы выдерживали 36°С 55 минут. Опыт останавливали добавлением 55 мкл 1М раствора HCl.

После, для извлечения продукта дансил-фен-ала добавляли к пробам по 1,6 мл хлороформа, активно взбалтывали в течение минуты центрифугированием (10 минут при 1000об/мин.) разделяли водную и хлороформную фазы

На флюориметре флюорат АБЛФ-Т измеряли флюоресценцию хлороформной фазы при $\lambda_{\text{ex}}=360$ нм и $\lambda_{\text{em}}=530$ нм в кювете толщиной 1 см..

Активностью фермента и была разность между приростом флюоресценции в пробах с добавлением и без добавления ГЭМЯК, и выражали в нмоль дансил-фен-ала, синтезируемого за 1 минуту выдержки в пересчете на 1 мг белка.

2.3.2 Определение активности фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы

В биохимии фенилметилсульфонилфторид представляет собой ингибитор сериновой протеазы, обычно используемый при получении клеточных лизатов. Он быстро разлагается в воде, и исходные растворы обычно готовят в безводном этаноле, изопропанолe, кукурузном масле или ДМСО. Протеолитическое ингибирование происходит, когда концентрация ФМСФ составляет 0,1 - 1 мМ. Период полураспада в водных растворах короткий: 110 мин при pH 7,55 мин при pH 7,5 и 35 мин при pH 8 при 25°C.

В активности ФМСФ-КП найдены половые различия. У самцов активность фермента в большинстве тканей ниже, чем у самок. Когда наступает период полового созревания, активность фермента меняется. Уменьшение активности ФМСФ-КП происходит из-за экзогенного тестостерона и прогестерона. Более значимые изменения активности ФМСФ-КП замечены в гипофизе и половых железах, как у самок, так и у самцов. Наименьшее воздействие половых стероидных гормонов выявлено в гипоталамусе .

Для определения активности ФМСФ-КП использовали субстрат дансил-фен-лей-арг определение проводилось на флюориметре..

Контрольная проба: брали 145 мкл 55 мМ натрий-ацетатного буфера, с содержанием 55 мМ NaCl, pH 5,5, 55 мкл препарата фермента и 15 мкл 30 мМ ФМСФ, разведенного на этаноле. ФМСФ добавляли в реакционную смесь после внесения препарата фермента.

Опытная проба: 155 мкл данного буфера и 55 мкл препарата фермента.

Пробы выдерживали при 37°C 8 мин, далее добавляли 55 мкл заранее разогретого до 36°C 215 мкМ раствора дансил-фен-лей-арг, разведенного на воде. После чего, пробы обрабатывали как и для КПЕ.

Разность между приростом флюоресценции в пробах содержащих и не содержащих ФМСФ и есть активность фермента.

2.4 Метод определения белка

Исследуемую концентрацию белка в гомогенатах из отделов нервной системы крыс определяли по Lowry [99].

2.5 Методы статистической обработки

По критерию хи-квадрат проводилась проверка распределения признаков к нормальному распределению [30]. С использованием t-критерия Стьюдента [30] проводилась проверка достоверности отличий между средними. При помощи дисперсионного анализа проводилась проверка отсроченного влияния препаратов и стресс-воздействий на активность пептидэргической системы. По методу Шеффе оценивалась принадлежность групп животных к гомогенным группам. По методике Ньюмена-Кейлса [88].проводилось сравнение значений из каждой группы дисперсного комплекса. При помощи эмпирического критерия корреляции производили корреляционный анализ.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Влияние семакса на активность карбоксипептидазы E и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы в отделах головного мозга и надпочечниках крыс

Особое внимание можно уделить синтетическому аналогу АКТГ₄₋₁₀ – семакс и синтетическому аналогу короткого участка тяжелой цепи иммуноглобулина G человека – селанк, удлиненные трипептидом Pro-Gly-Pro ноотропного действия, синтезированные под руководством академика РАМН И.П. Ашмарина учеными Института молекулярной генетики РАН и Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова. Благодаря исследованиям на здоровых добровольцах и животных было показано, что ноотропный эффект семакса проявляется и при назначении его в малых дозах. (3-30 мкг/кг) [25].

Дозы, которые содержат большее количество семакса (150-300 мкг/кг), так же сохраняют ноотропное действие малых доз, не являются токсичными, оказывают антиоксидантное, ангиопротектное, антигипоксическое и нейротрофические свойства. [2]. Благодаря исследованиям на животных моделях и культурах тканей церебральной ишемии, и клиническим опытам были выявлены нейропротективные действия семакса, выражающиеся его влиянием на практически все механизмы отсроченной гибели: восполнение, синтез оксида азота, активацию микроглии, цитокиновый дисбаланс, оксидантный стресс, трофическую дисфункцию [3, 8, 19]. Возможно, что большая часть физиологических эффектов данного препарата вызвана последовательностью АКТГ₄₋₇ [1, 18], но явным отличием от природного аналога является то, что нет гормонального эффекта, размером доз и продолжительностью действия. [71, 78]. это может быть связано с последовательным и замедленным разрушением препарата, что способствует сохранению эффектов нейропептида у его фрагментов [6], и, возможно с влиянием семакса и его фрагментов на содержание эндогенных нейропептидов, согласно концепции

«функционального континуума» [7, 8]. В списке работ [5, 9] можно увидеть увеличение количества регуляторных пептидов при приеме семакса. К сожалению, сейчас молекулярные механизмы этих процессов малоизученны.

Как уже было сказано, КПЕ участвует в производстве почти всех нейропептидов и пептидных гормонов. Фермент воздействует на экзопептидазу для активации нейропептидов. Он отщепляет основные С-концевые аминокислоты, получая активную форму пептида. КПЕ специфически связывает регулируемые секреторные белки, включая прогормоны. Карбоксипептидаза Е имеет несколько функций. Известно, что активная форма КПЕ находится в секреторных везикулах, где она действует как экзопептидаза для активации нейропептидов. Она отщепляет основные С-концевые аминокислоты, образуя активную форму пептида. Продукты КПЕ включают в себя инсулин, энкефалины, вазопрессин, окситоцин, и большинство других нейроэндокринных пептидных гормонов и нейропептидов. Также было высказано предположение, что мембраносвязанная КПЕ действует как сигнал сортировки регулируемых секреторных белков в сети транс-Гольджи гипофиза и в секреторных гранулах. Регулируемые секреторные белки - это в основном гормоны и нейропептиды. Тем не менее, эта роль для КПЕ остается спорной, данные показывают, что этот фермент не является необходимым для сортировки регулируемых секреторных белков.

Впервые выделили и описали ее Снайдер и Фрикер в 1982г., которые выделили и очистили КПЕ из надпочечников быка, и получили В-подобный фермент, свойства которого предполагают, что он участвует при обработке энкефалины и других нейропептидов. Через некоторое время этими же учеными КПЕ была выделена из головного мозга [14]. Исследования показали, что она содержится в мозге, во всей нейроэндокринной системе (в том числе в эндокринной поджелудочной железе), гипофизе и в гранулах хромаффина надпочечников. КПЕ присутствует во всех видах позвоночных,

а также во многих других организмах, которые были изучены (нематоды, морских моллюсков) [13].

КПЕ находится как в растворимом гликопротеине в нейроэндокринных тканях и гранулах хромаффина надпочечников, так и в мембране. Таким образом, КПЕ существует не только в растворенной (более активной), но и в мембраносвязанной форме. Данная форма в свою очередь делится на два вида, главным отличием которых является прочность связывания с мембранами. Первый вид экстрагируется из мембран 1 М раствором NaCl при pH= 5,6, а второй – при объединенном воздействии 1 М NaCl и 1% Тритона X-100 [23,30]. Растворенная и мембраносвязанная формы КПЕ имеют отличия в механизмах, регулирующих их активность [27]. В некоторых источниках имеются данные, что мембраносвязанная форма имеет возможность перехода в растворенную форму, когда происходит увеличение pH [28], при холестероловом истощении мембран [29].

На рисунке 1 представлены результаты определения активности КПЕ в надпочечниках и отделах мозга самцов крыс. При введении дистиллированной воды интраназально наблюдалось повышение активности КПЕ в гипофизе через 0.5, 4, и 24 часа после введения.. активность исследуемого фермента в гипоталамусе наблюдалась через 0.5 и 4 часа после введения дистиллированной воды.. снижение активности КПЕ в стриатуме наблюдалось через 4 часа , а активность КПЕ в надпочечниках была понижена на протяжении всего эксперимента. После введения дистиллированной воды активность ФМСФ-КП была значительно снижена на протяжении всего исследования. (рис. 2).

После проведенного исследования можно сделать вывод о том, что интраназальное введение дистиллированной воды вызвало те же изменения в активности исследуемых ферментов, что и эмоционально-болевого стресс, а именно увеличение активности КПЕ в гипоталамусе и гипофизе и снижение активности КПЕ и ФМСФ-КП в надпочечниках.

Возможно, КПЕ и ФМСФ-КП являются одними из главных ферментов в регуляции процессинга биологически-активных пептидов, следовательно, им может принадлежать важная роль в контроле над уровнем активных форм нейропептидов при введении дистиллированной воды интраназально, что возможно, само по себе, может являться стрессирующим фактором .

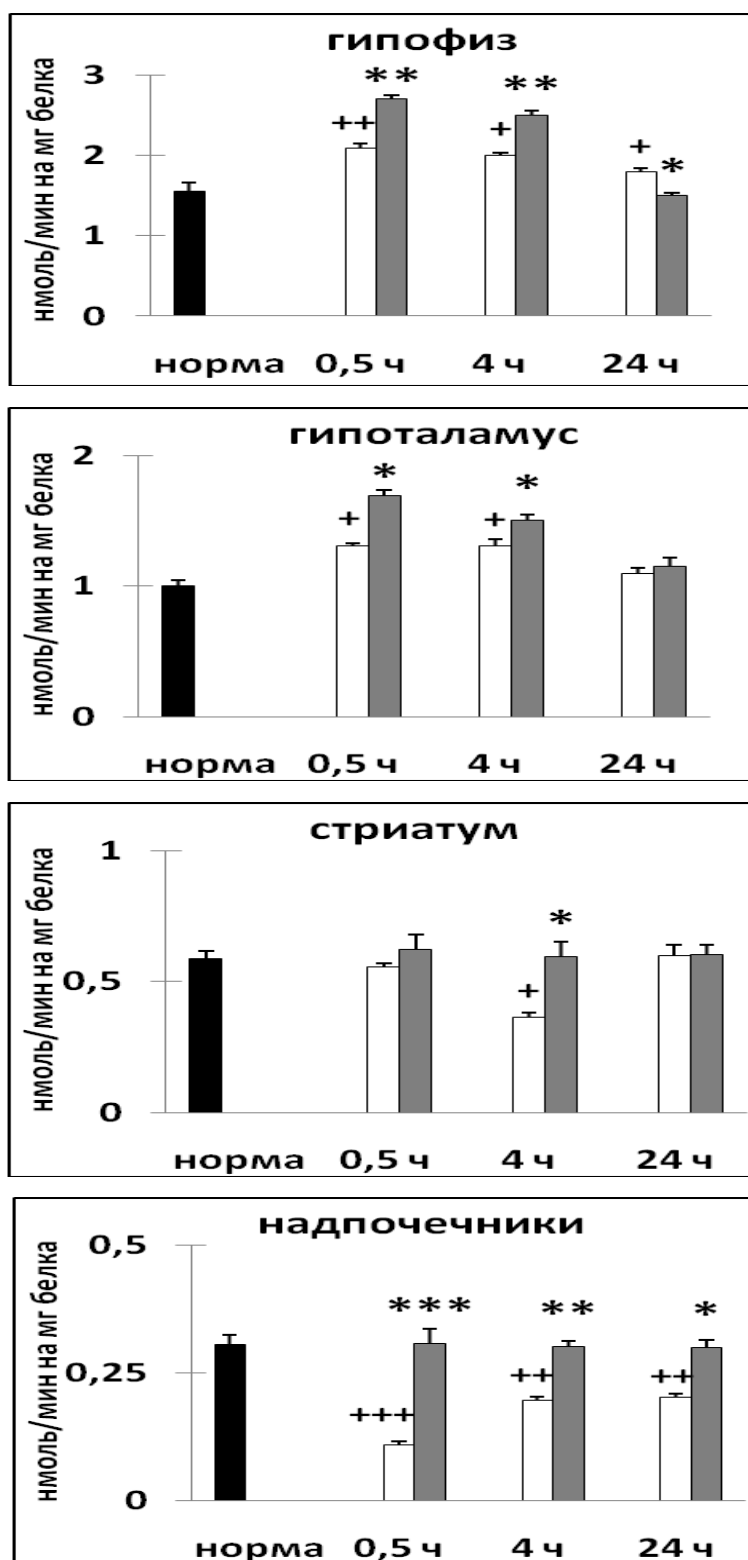


Рис 1. Влияние семакса на активность карбоксипептидазы E в отделах мозга и надпочечниках крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 минуту инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=7$).

На рисунке 2 : ■ - интактная группа, □ - контроль, ■ - семакс 300 мг/кг. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ относительно контроля, + – $p < 0,05$, ++ – $p < 0,01$, +++ – $p < 0,001$ относительно интактной группы.

После капельного введения семакса в дозе 300 мг/кг наблюдались следующие изменения: в гипофизе, относительно контрольной группы активность КПЕ возрастала через 0.5 и 4 часа, но к 24 часам активность фермента по отношению к контрольной группе снижалась (рис. 1); в гипоталамусе наблюдалось повышение активности КПЕ через 0.5 и 4 часа; в стриатуме активность возрастала спустя 4 часа после инстилляции, а в надпочечниках- на протяжении всего исследования. Так же в надпочечниках было зафиксировано возрастание активности ФМСФ-КП через 0.5, 4 и 24 часа спустя интраназального введения семакса.

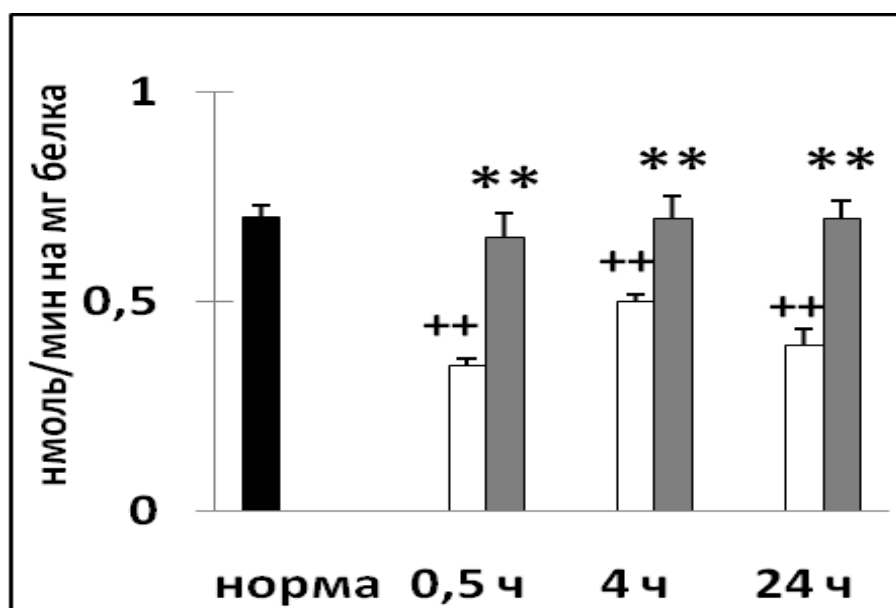


Рис. 2 зависимость активности ФМСФ-КП от введения семакса в надпочечниках крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 минуту инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=7$).

Как известно, гипоталамус и гипофиз это отделы, которые продуцируют большой спектр регуляторных пептидов. [92]. Исходя из результатов исследований последних лет можно сделать вывод, что КПЕ является одним из важнейших регуляторов в процессинге множества нейропептидов (окситоцина, аденокортикотропного гормона, вещества Р,

вазопрессина[15]. и др.) возможно, что возрастание активности КПЕ в гипоталамусе и гипофизе при введении семакса приводит к повышению уровня регуляторных пептидов, участвующих в процессах обучения, запоминания. Так же при введении препарата возможно, что происходит опосредование увеличения уровня нейротрофических факторов[23].

Тот факт, что наблюдается возрастание активности КПЕ в стриатуме и надпочечниках, и ФМСФ-КП в надпочечниках до уровня нормы, по отношению в контрольной пробе, свидетельствует о том, что семакс обладает выраженным антистрессорным действием

Очень интересен сам механизм воздействия семакса на исследуемые ферменты, так как известно, что его влияние никак несвязанно с прямым воздействием на активность КПЕ и ФМСФ-КП(исследования *in vitro* это доказали. (Табл.1)). Интересным является тот факт, что при введении семакса наблюдается увеличение экспрессии некоторых генов, но влияет ли препарат на экспрессию гена именно КПЕ и ФМСФ-КП точно не известно. Скорее всего, опосредованное воздействие семакса на активность карбоксипептидаз осуществляется через влияние препарата на различные нейромедиаторные системы.

Таблица 1.зависимость активности КПЕ и ФМСФ-КП от введения семакса *in vitro* (в % от контроля, контроль 100 %)

Отделы	КПЕ	ФМСФ-КП
гипоталамус	108	—
гипофис	104	—
надпочечники	104	100
стриатум	99	—

Зная о том, что при паталгических состояниях происходи угнетение работы системы регуляторных пептидов[15, 26, 96] и тот факт, что повышение активности КПЕ и ФМСФ-КА приводит к активизации пептидергической системы , можно предположить, что применение семакса может справацировать положительный фармакологический эффект, так как о непосредственно вызывает активизацию исследуемых пептидов.

Чаще всего препарат принимают в следующих случаях:.. состояния непосредственно после наркоза (успешного или нет), нейрохирургического воздействия и ЧМТ;энцефалопатия дисциркуляторного типа;расстройства мнестического типа, возникающие при сосудистых проблемах головного мозга;необходимость усиления адаптационных возможностей у человеческого организма, возникающая в различных критических ситуациях;переутомления психического типа, возникающие при однотипной деятельности в пиковые периоды работы в условиях повышенного стресса.атрофия у зрительного нерва;различные невриты, имеющие токсико-аллергическую, а также воспалительную этиологию;нарушения кровообращения, преимущественно преходящего типа, включая неврорасстройства, имеющие разнотипный вариативный генез, например, после непосредственного ионизирующего излучения; этап восстановления после инсульта (во время острого периода данная дозировка не подойдёт); синдром дефицита внимания в сочетании с гиперактивностью и иные минимальные дисфункции детей, относящиеся к мозгу – тогда препарат выступает в качестве лекарства ноотропного типа.

3.2 Влияние селанка на активность карбоксипептидазы Е и фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы в отделах головного мозга и надпочечниках крыс

Благодаря научным работам современных лет, стало известно, что гептапептид селанк вместе с анксиолитическим действием оказывает еще множество других эффектов – ноотропный, стимулирующий и стресс-протективный [3, 7, 56, 88,99]. в настоящий момент, Нейрохимические механизмы психотропного действия селанка не изучены до конца. Проведенные исследования дали понять, что нет возможности до конца разобраться в действии препарата на обмен медиаторов (дофамина, серотонина) [48] и нейротрансмиттерных аминокислот [16] в коре и подкорковых структурах головного мозга. Была выдвинута гипотеза о том [17], что возможная способность селанка ингибировать ферменты деградацией энкефалинов, и дает его психотропный эффект, давая тем самым их накопление, что было подтверждено экспериментально [4].

Как известно, количество регуляторных пептидов варьируется в зависимости от активности ферментов их деструкции, и так же соотношения скоростей их синтеза и распада [6]. Следовательно, для окончательного понимания механизмов действия семакса и селанка необходимо знать функциональное взаимодействие данных препаратов с ферментами процессинга регуляторных пептидов, в частности КПЕ и ФМСФ-КП.

На данном этапе подтверждено наличие внутренних резервов организма, способных к преодолению воздействия на него негативных факторов. Проводимые в настоящее время исследования биохимического и клинического характера, доказывают, что большинство функций организма контролируются работой пептидергической системы. Считается, что возможность использования семакса и селанка при физической работе позволяет применять их в качестве биорегуляторов, с целью повышения адаптационных возможностей организма, но эффективность данного метода на сегодняшний день недостаточно доказана. Исходя из того, что

использование исследуемых препаратов в высоких дозировках не дает побочных эффектов и обладает выраженным протективным эффектом мы можем считать их препаратами «нового поколения», о которых говорилось в отчетах Комитета по долгосрочной политике в создании новых лекарственных средств при Японской медицинской ассоциации: «Препараты будущего должны обладать едва заметным эффектом или не оказывать эффекта в здоровом организме, но проявлять специфическое направленное действие при патологических сдвигах в организме» [11].

Как было уже сказано, наиболее высокая активность ФМСФ-ингибируемая КП замечена в надпочечниках, а так же во всех отделах мозга и в большом количестве тканей, кроме почек. В отделах головного мозга активность ФМСФ-КП ниже, чем в периферических тканях и еще ниже, чем в гипофизе. В мозге самая высокая активность ФМСФ-ингибируемой КП проявляется в отделах с преобладанием серого вещества (обонятельных луковицах) или с высоким содержанием нейропептидов (гипоталамусе), а самая низкая - в четверохолмии и гиппокампе.

ФМСФ специфично связывается с активным центром серинового остатка в сериновой протеазе. При этом она не связывает каких-либо других сериновых остатков в белке. Это является результатом гиперактивности этого серинового остатка, вызванного специфическими условиями окружающей среды в активном центре фермента. Поскольку ФМСФ имеет ковалентную связь с ферментом, комплекс можно рассматривать с помощью рентгеновской кристаллографии, и поэтому его можно использовать в качестве химической метки для идентификации основного активного серинового центра в ферменте.

После того, как был введен сланк, было замечено существенное снижение активности КПЕ, в отличии от контрольной группы . в гипофизе- во время всего исследования, в гипоталамусе- через 0,5 и 4 часа после введения. (рис. 3).из всего этого можно сделать вывод, что селанк обладает

стресс-протективным действием, за счет ингибирования гипоталамо-гипофизарной системы и снижения выделения стресс-пептидов.

Влияние введения селанка на активность КПЕ: в стриатуме было замечено повышение активности через 4 часа после введения; в надпочечника- значение активности фермента превышало цифры контрольной группы на протяжении всего времени исследования, но так же было замечено и повышение активности ФМСФ-КП через 0,5, 4 и 24 часа после введения препарата (рис. 4).

Как мы знаем, надпочечники и стриатум синтезируют юольшое количество нейропептидов, (Met- и Leu-энкефалины), которые обладают стресс-протективным действием [91, 98].возможно, что повышение активности ферментов процессинга данных пептидов может спровоцировать стресс-протективный эффект селанка [28, 29, 36].

Исходя из того, что изменение активности исследуемых ферментов замечалось только там, где было стрссирующее влияние от введения дистиллированной воды, но при этом значение активности карбоксипептидаз возвращалось к значениям интактной группы и не отличалось от нее, то можно предположить, что инстилляця дистиллированной воды вызвало стресс-реакцию, отмечающуюся изменением активности основных карбоксипептидаз , которые непосредственно участвуют в активации стресс-пептидов в гипофизе и гипоталамусе [93]. В надпочечниках наблюдалась совершенно другая картина. Стресс вызывал снижение активности ферментов, возможно это было обусловлено снижением уровня энкефалинов. После введение селанка было замечено выравнивание данных изменений, и возможное уменьшение образования стрессорных пептидов, за счет угнетения ферментов их процессинга

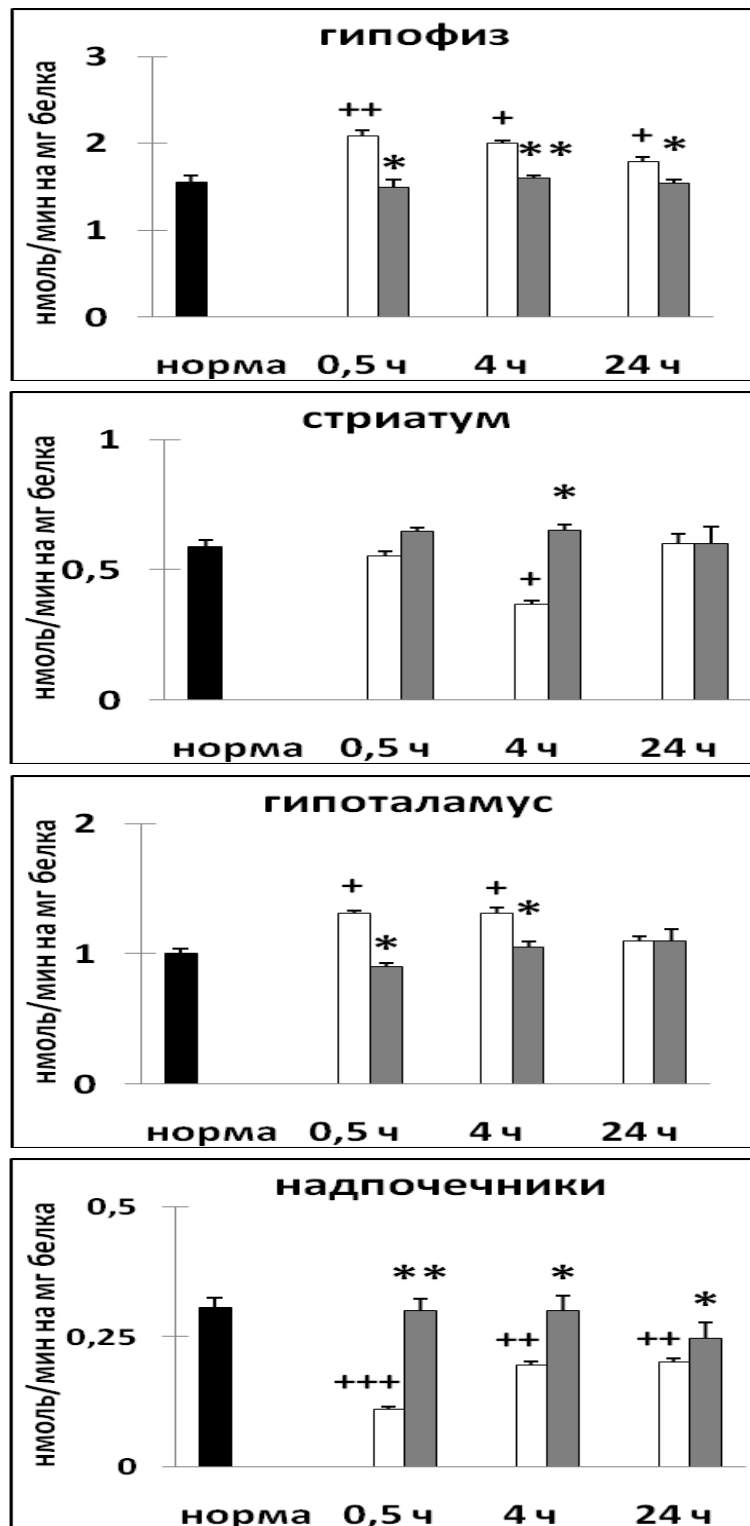


Рис 3. зависимость активности КПЕ в отделах мозга и надпочечниках крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 минуту инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=7$). Здесь и на рис. 16: ■ - интактная группа, □ - контроль, ■ - селанк 300 мкг/кг. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ относительно контроля, + – $p < 0,05$, ++ – $p < 0,01$, +++ – $p < 0,001$ относительно интактной группы

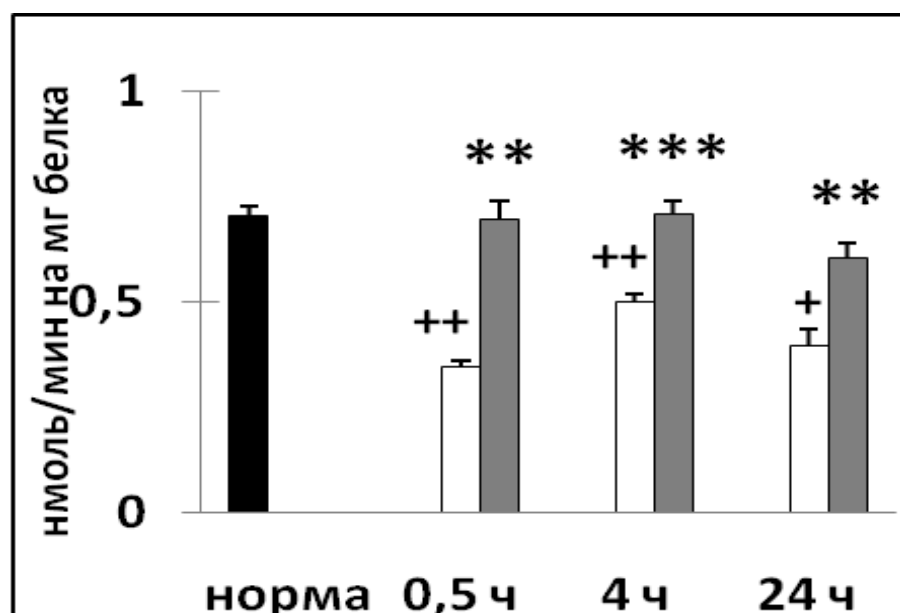


Рис.4.зависимость активности ФМСФ-КП от воздействия в надпочечниках крыс (нмоль продукта, образовавшегося за 1 минуту инкубации на 1 мг белка, $M \pm m$, $n=6-7$).

Так же как и семакс, селанк на прямую никак не влияет на активность ферментов, это доказали опыты, проводимые *in vitro*. (таб.2). В связи с этим, вопрос о механизме действия селанка вызывает особый интерес

Таблица 2. зависимость активности ФМСФ-КП от воздействия селанка *in vitro* (в % от контроля, контроль 100 %)

Отделы	КПЕ	ФМСФ-КП
гипоталамус	98	—
гипофиз	96	—
Надпочечники	102	95
стриатум	101	—

скорее всего, что так же как и с семаксом, влияние на активность ферментов *in vivo* селанка осуществляется за счет его воздействия на нейромедиаторные системы.

Эффект от использования селанка заключается в следующем: Выраженное анксиолитическое действие через систему ГАМК в мозге. А

также препятствует повышению уровня тревожных нейромедиаторов (норадреналин) в эмоциогенных центрах головного мозга, повышая здесь уровень эндогенных антидепрессантов энкефалинов (схожи с эндорфинами) – тех веществ, которые уже вырабатываются в нашем организме.

Ускорение создания мРНК в гиппокампе мРНК – как схема, план для синтеза белковых структур в гиппокампе. Гиппокамп – отдел мозга, ответственный за память и обучаемость, Улучшение памяти

При высоком эмоциональном стрессе, эффекты превосходят даже пираретам Это не удивительно, ведь мы обычно демонстрируем интеллект, когда в нас не бурлят эмоции, а лишь спокойный здравый рассудок.

Повышает сниженный уровень серотонина Серотонин – гормон удовольствия жизни, его низкие значения часто связаны с депрессиями, Селанк повышает серотонин, если он снижен.

После проведенных исследований можно сказать, что КПЕ и ФМСФ-КП возможно, играют немаловажную роль в контроле уровня активных форм нейропептидов под действием селанка и семакса. Благодаря проведенным исследованиям изменений уровня регуляторных пептидов и активности ферментов, их обмена под влиянием стрессовых ситуаций можно сделать вывод о том, что резкое повышение активности пептидэргической системы способствует адекватной адаптации организма к стрессовой ситуации, включая изменение метаболизма в нужном направлении, что в совокупности обеспечивает повышение работоспособности, выносливости, а это, в свою очередь доказывает то, что пептидэргическая система непосредственно связана с работоспособностью организма. На данном этапе довольно хорошо известно, что у организма имеются внутренние резервы, которые необходимы для жизнедеятельности в стрессовых ситуациях и при воздействии на него неблагоприятных факторов.. Исследуемые препараты (семакс, селанк) в высоких дозах оказывают нейропротективный и стимулирующий эффекты [32, 47, 52], биологический нейрхимический

механизмы которых , возможно, связаны с влиянием на ферменты, участвующие в биосинтезе регуляторных пептидов (рис. 1-4), следовательно, они могут оказывать эффективное терапевтическое действие, увеличивать внутренние резервы, а так же способности к обучению и память.

Показания к применению исследуемых препаратов:

- нарушения мозговой деятельности в результате поражения сосудов головного мозга;
- дисциркулярная энцефалопатия;
- восстановление после перенесения черепно-мозговой травмы, наркоза и нейрохирургических операций;
- нарушение стабильного мозгового кровообращения (ТИА), а также множественные расстройства нервной системы различного рода происхождения, в т.ч. после радиоактивного излучения;
- реабилитация после инсульта;
- для повышения уровня адаптационных процессов организма человека в экстремальных ситуациях, профилактики психического и неврологического утомления при однообразной операторской работе в наиболее загруженные периоды деятельности ЦНС.

В офтальмологии:

- при нарушении работы зрительного нерва, токсико-аллергической реакции;

В педиатрии:

- у детей в дошкольном возрасте (от 5 лет) как успокоительное, ноотропное средство при малейшем нарушении мозговой деятельности, таких как СДВГ (синдром дефицита внимания с гиперактивностью).

ВЫВОДЫ

1. после воздействия стрессорного фактора в виде введения интраназально дистиллированной воды и последующим введением препаратов семакса и селанка наблюдается повышение активности ферментов процессинга пептидэргической активности КПЕ и ФМСФ-КП
2. повышение активности КПЕ и ФМСФ-КП способствует активации адаптационных ресурсов организма
3. исследуемые препараты оказывают нейропротективный стимулирующий эффект
4. исследования показали, что данные препараты можно принимать в терапевтических целях, для повышения работоспособности, улучшения памяти, способности концентрации внимания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин, И. П. Функционально связанные комплексы эндогенных регуляторов / И. П. Ашмарин, С. В. Королева // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2006. – № 5. – С. 3– 6.
2. Ашмарин, И. П. Кооперативное действие регуляторных пептидов в пороговых и подпороговых концентрациях / И. П. Ашмарин, Т. В. Лелекова, Н. П. Пальмина, Н. А. Соколова, С. А. Чепурнов // Информационный бюллетень РФФИ. – 1996. – № 4. – С. 710– 720.
3. Вернигора, А. Н. Влияние тестостерона и прогестерона на активность карбоксипептидазы Н в гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси и надпочечниках мышей / А. Н. Вернигора, Д. А. Салдаев, М. Т. Генгин // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2000. – № 4. – С. 455– 458.
4. Вернигора, А. Н. Распределение активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы в тканях и отделах головного мозга ежа европейского (*Erinaceus europaeus*) / А. Н. Вернигора, Н. В. Щетинина, М. Т. Генгин // Укр. биохим. журн. – 1996. – № 5. – С. 118– 121.
5. Вернигора, А. Н. Распределение активности основных карбоксипептидаз в тканях лабораторных животных разных видов / А. Н. Вернигора, Н. В. Щетинина, Д. А. Салдаев, М. Т. Генгин // Жур. эволюц. биохим. физиол. – 2002. – № 1. – С. 25– 27.
6. Гомазков, О. А. Нейротрофические и ростовые факторы мозга: регуляторная специфика и терапевтический потенциал / О. А. Гомазков // Успехи физиологических наук. – 2005. – № 2. – С. 22– 40.
7. Гомазков, О. А. Нейротрофические факторы мозга. Справочно-информационное издание / О. А. Гомазков. – М.: Издательский центр «НИИ биомед», 2004 – 311 с.
8. Гомазков, О. А. Регуляция биосинтеза энкефалинов: биохимические и физиологические аспекты / О. А. Гомазков, О. О. Григорьянц // Успехи совр. биол. – 1989. – № 1. – С. 109– 124.

9. Гомазков, О. А. Регионарная активность энкефалин- и ангиотензин II-образующих пептидаз мозга и периферических тканей у крыс с различным влечением к этанолу / О. А. Гомазков, А. П. Ростовцев, Н. В. Комиссарова, В. В. Фомин, О. О. Григорьянц // *Вопр. мед. химии.* – 1991. – № 4. – С. 33– 37.

10. Горбачев, А. Л. Эффективность пептидного биорегулятора при коррекции пониженной функции щитовидной железы у жителей магаданского региона / А. Л. Горбачев, Е. А. Луговая, Г. А. Рыжак, В. Х. Хавинсон // *Успехи геронтологии.* – 2005. – № 16. – С. 80– 87.

11. Каменский, А. А. Влияние синтетического аналога фрагмента аргинин-вазопрессина на процесс обучения крыс / А. А. Каменский, О. Г. Воскресенская, В. А. Дубинин, Н. Г. Левитская // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* – 2001. – № 11. – С. 149–150.

12. Каменский, А. А. Нейрохимия / А. А. Каменский, Н. Ф. Мясоедов, Н. Г. Левицкая, Л. А. Андреева, Е. А. Себенцова, Н. Ю. Глазова, Д. А. Виленский, Д. М. Манченко // *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова.* – 2008. – № 2. – С.111– 118.

13. Ковальзон, В. М. Нейрохимия Скрытые свойства нейропептидов: гипногенная активность трипептидного комплекса DSIP + NPY + ANP / В. М. Ковальзон, Г. Н. Фесенко, В. Н. Калихевич, З. А. Ардемасова, С. В. Королева, И. П. Ашмарин // *Нейрохимия.* – 2006. – № 1. – С. 63– 66.

14. Козина, Л. С. Регуляторные пептиды защищают нейроны мозга от гипоксии в экспериментах *in vivo* / Л. С. Козина, А. В. Арутюнян, С. Л. Стволинский, М. С. Степанова, М. Г. Маклецова, В. Х. Хавинсон // *Доклады Академии наук.* - 2008. – № 3. – С. 419– 422.

15. Королева, С. В. Разработка и применение экспертной системы анализа функционального континуума регуляторных пептидов (обзорная статья) / С. В. Королева, И. П. Ашмарин // *Биоорганическая химия.* – 2006. – № 3. – С. 249– 257.

16. Николаева, А. А. Построение обобщенной схемы индукционных связей между норадреналином и регуляторными пептидами / А. А.

Николаева, С. В. Королева, И. П. Ашмарин // Нейрохимия. – 2008. – № 3–. С. 191– 201.

17. Середенин, С. Б. Роль серотонинергического компонента в формировании противотревожного действия синтетического аналога тафтсина / С. Б. Середенин, М. М. Козловская, Т. П. Семенова // Клин. фармакология и токсикология. – 1995. – № 6. – С. 2– 6.

18. Степаненко, Р. Н. Применение мультипараметрической проточной цитометрии для одновременной оценки функции и фенотипа $\gamma\kappa$ -клеток / Р. Н. Степаненко, Н. К. Рязанов, О. А. Молдокулов, Р. Я. Власенко // Иммунология. – 1991. – № 11. – С. 55-57.

19. Хавинсон, В. Х. Метод повышения резервных возможностей организма спортсменов высокой квалификации / В. Х. Хавинсон, И. А. Винер, С. В. Трофимова, А. В. Трофимов, А. В. Дудков // Международный журнал по иммунореабилитации. – 2010. – № 2. – С. 242– 245.

20. Шейман, И. М. Пептидные нейрогормоны беспозвоночных / И. М. Шейман, Э. Ф. Балобанова // Успехи соврем. биологии. – 1989. – № 2. – С. 203-214.

21. Щетинина, Н. В. Тканевое и региональное распределение активности фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы и других карбоксипептидаз у крыс / Н. В. Щетинина, А. Н. Вернигора, М. Т. Генгин, Н. В. Фирстова, // Укр. биохим. журн. – 1997. – № 3. – С. 23-28.

22. Mitogenic and melanogenic stimulation of normal human melanocytes by melanotropic peptides / Z. Abdelmalek // PNAS USA. – 1995. - Vol. 92. – P. 1789– 1799.

23. Almay, B. G. Endorphins in chronic pain. I. Differences in CSF endorphin levels between organic and psychogenic pain syndromes / B. G. Almay, F. Johansson, L.Von Knorring, L. Terenius, A. Wahlström // Pain. – 1978. – Vol. 5. – P. 153– 162.

24. Anton, F. S. Role of GGF/neuregulin signalling in interaction between migrating neurones and radial glia in the developing cerebral cortex / F. S. Anton, M. A. Marchionni, K. F. Lee, P. Rakis // *Development*. – 1997. – Vol. 124. – P. 3501– 3510.
25. Arihara, Z. Immunoreactive orexin-A in human plasma / Z. Arihara // *Peptides*. – 2001. – Vol. 22. – P. 139– 142.
26. Ashmarin, I. P. Search for evolutionary ancient, relict, regulatory peptides / I. P. Ashmarin, E. P. Karazeeva // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2007. – Vol. 1. – P. 123– 125.
27. Baraniuk, J. N. Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain / J. N. Baraniuk, G. Whalen, J. Cunningham, D. J. Clauw // *BMC Musculoskelet Disord*. – 2004. – Vol. 5. – P. 48– 55.
28. Blevins, J. E. Oxytocin innervation of caudal brainstem nuclei activated by cholecystokinin / J. E. Blevins, T. J. Eakin, J. A. Murphy, M. W. Schwartz, D. G. Baskin // *Brain Res*. – 2003. - Vol. 993. – P. 30– 41.
29. Bonten, E. J. Lysosomal protective protein/cathepsin A. Role of the "linker" domain in catalytic activation / E. J. Bonten, N. J. Galjart, R. Willemsen, M. Usmany, J. M. Vlak // *Biol Chem*. – 1995. – Vol. 44. – P. 264– 264.
30. Brain, S. D. Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets / S. D. Brain, H. M. Cox // *Br J Pharmacol*. – 2006. – Vol. 147. – P. 202– 211.
31. Bull, P. M. The role of nitric oxide in morphine dependence and withdrawal excitation of rat oxytocin neurons / P. M. Bull, M. Ludwig, G. J. Blackburn-Munro, H. Delgado-Cohen, C. H. Brown, J. A. Russell // *Eur. J Neurosci*. – 2003. - Vol. 18. – P. 254– 255.
32. Bundel, D. Angiotensin IV and LVV-haemorphin 7 enhance spatial working memory in rats: effects on hippocampal glucose levels and blood flow / D. Bundel, I. Smolders, R. Yang, A. L. Albiston, Y. Michotte, S. Y. Chai // *Neurobiol. Learn. Mem*. – 2009. - Vol. 92. – P. 19– 26.

33. Cameron, V. A. C-type natriuretic peptide expression in olfactory regions of rat brain is modulated by acute water deprivation, salt loading and central angiotensin II / V. A. Cameron // *Neuroendocrinol.* – 2001. – Vol. 73. – P. 46– 53.
34. Colledge, W. H. Kisspeptins and GnRH neuronal signalling / W. H. Colledge // *Trends in Endocrinology and Metabolism* – 2009. – Vol. 20. – P. 115– 121.
35. Desprat, C. Hypothermic effects of neuropeptide FF analogues in mice / C. Desprat, J. M. Zajac // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1997. – Vol. 58. – P. 559– 563.
36. Diaz, E. Role of brain dopaminergic system in the adrenomedullin-induced diuresis and natriuresis / E. Diaz, M. Silva, A. Israel // *Pharmacol Res.* – 2003. – Vol. 48. – P. 489– 496.
37. Dong, E. Involvement of diazepam binding inhibitor and its fragment octadecaneuropeptide in social isolation stress-induced decrease in pentobarbital sleep in mice / E. Dong, K. Matsumoto, M. Tohda, H. Watanabe // *Life Sci.* – 1999. – Vol. 64. – P. 177– 178.
38. Does, R. M. Evolution of POMC: origin, phylogeny, posttranslational processing, and the melanocortins / R. M. Does, A. J. Baron // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2011. – Vol. 1220. – P. 34– 48.
39. Dumont, Y. A selective CGRP(2) agonist, [Cys(Et)(2,7)]hCGRP - comparison in prototypical CGRP(1) and CGRP(2) in vitro bioassays / Y. A. Dumont // *Can. J Physiol. Pharmacol.* – 1997. – Vol. 75. – P. 671– 676.
40. Eremin, K.O. Semax, an ACTH(4-10) analogue with nootropic properties, activates dopaminergic and serotonergic brain systems in rodents / K. O. Eremin, V. S. Kudrin, P. Saransaari // *Neurochemical Research.* – 2005. – Vol. 30. – P. 1493– 1500.
41. Fekete, A. Gastrin-releasing peptide microinjected into the amygdala inhibits feeding / A. Fekete // *Brain Res.* – 2002. – Vol. 955. – P. 55– 63.

42. Fricker, L. D. Neuropeptide-Processing Enzymes: Applications for Drug Discovery / L. D. Fricker // AAPS Journal. – 2005. – Vol. 07. – P. 449– 455.
43. Fricker, L. D. Identification of the pH dependent membrane anchor of carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10) / L. D. Fricker, B. Das, R. H. Angeletti // J. Biol. Chem. – 1990. – Vol. 5. – P. 247– 228.
44. Fricker, L. D. Reflex splanchnic nerve stimulation increases levels of carboxypeptidase E mRNA and enzymatic activity in the rat adrenal medulla / L. D. Fricker, R. J. Rigual, E. J. Jr. Diliberto, O. H. Viveros // J. Neurochem. – 1990. – Vol. 2. – P. 461– 467.
45. Fricker, L. D. Enkephalin convertase: purification and characterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenal chromaffin granules / L. D. Fricker, S. H. Snyder // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – Vol. 79. – P. 388– 389.
46. Gilman, C. P. Glucagon-like peptide 1 modulates calcium responses to glutamate and membrane depolarization in hippocampal neurons / C. P. Gilman, T. Perry, K. Furukawa, N. H. Grieg, J. M. Egan, M. P. Mattson // J Neurochem. – 2003. – Vol. 87. – P. 113– 114.
47. Godlewski, J. Somatostatin, substance P and calcitonin gene-related peptide-positive intramural nerve structures of the human large intestine affected by carcinoma / J. Godlewski, J. Kaleczyc // Folia Histochem. Cytobiol. – 2010. – Vol. 48. – P. 475– 483.
48. Halabisky, B. Excitatory input onto hilar somatostatin interneurons is increased in a chronic model of epilepsy / B. Halabisky, I. Parada, P. S. Buckmaster, D. A. Prince // J Neurophysiol. – 2010. – Vol. 104. – P. 221– 222.
49. Hanna, W. L. Tan Fulong, Froelich C.J. Dominant chymotrypsin-like esterase activity in human lymphocyte granules is mediated by the serine carboxypeptidase called cathepsin A-like protective protein / W. L. Hanna, J. M. Turbov // Immunol. – 1994. – Vol. 10. – P. 466– 467.
50. Harvey, J. Leptin: a multifaceted hormone in the central nervous system / J. Harvey // Mol. Neurobiol. – 2003. – Vol. 28. – P. 245– 258.

51. Hegarty, A. Vasopressin and V-1-receptor antagonists modulate the activity of solitary tract nucleus neurons receiving baroreceptor input / A. Hegarty, R. Felder // *Amer. J. Physiol. Regul. Integr.* – 1997. – Vol. 42. – P. 143– 152.

52. Hosoda, H. Ghrelin and the regulation of food intake and energy balance / H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa // *Mol Intervent.* – 2002. – Vol. 2 – P. 494– 503.

53. Ishii, S. Hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway activated by a reduction in circulating leptin, but not by an increase in circulating ghrelin, contributes to hyperphagia associated with triiodothyronine-induced thyrotoxicosis / S. Ishii, J. Kamegai, H. Tamura, T. Shimizu, H. Sugihara, S. Oikawa // *Neuroendocrinology.* – 2003. – Vol. 78. – P. 321– 330.

54. Jackman, H. L. IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Nomenclature and symbolism for amino acids and peptides / H. L. Jackman // *Biochem J.* – 1984. – Vol. 219. – P. 345–373.

55. Jonhagen, A. Calcitonin gene related peptide and neuropeptide Y in skeletal muscle after eccentric exercise: a microdialysis study / A. Jonhagen, P. Ackermann, T. Saartok, P. A. Renstrom // *J Sports Med.* – 2006. – Vol. 40. – P. 264–267.

56. Juaneda, C. Adrenomedullin receptor binding sites in rat brain and peripheral tissues / C. Juaneda, Y. Dumont, J. G. Chabot, A. Fournier, R. Quirion // *Eur J Pharmacol.* – 2003. – Vol. 474. – P. 165– 174.

57. Kask, K. Galanin receptors: involvement in feeding, pain, depression and Alzheimers disease / K. Kask // *Life Sci.* – 1997. – Vol. 60. – P. 15– -23.

58. Kastin, A. J. Interactions of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) with the blood-brain barrier / A. J. Kastin, V. Akerstrom, W. Pan // *J Mol. Neurosci.* – 2002. – Vol. 18. – P. 7-14.

59. Katsura, M. Functional involvement of endogenous anxiogenic neuropeptide in brains / M. Katsura, S. Ohkuma // *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* – 2004. – Vol. 24. – P. 119– 123.

60. Kis, B. Adrenomedullin, an autocrine mediator of blood-brain barrier function / B. Kis, C. S. Abraham, M. A. Deli, H. Kobayashi, M. Niwa, H. Yamashita, D. W. Busija // *Hypertens Res.* – 2003. – Vol. 26. – P. 61– 70.
61. Ko, M. Effects of Nociceptin/Orphanin FQ Administered Intrathecally in Monkeys / M. Ko, N. N. Naughton // *J Pain.* – 2009. - Vol. 10. – P. 509–516.
62. Koroleva, S. V. Functional continuum of regulatory peptides (RPS): vector model of RP -effects representation / S. V. Koroleva, I. P. Ashmarin // *Journal of Theoretical Biology.* – 2002. – Vol. 216. – P. 257– 271.
63. Lafrance, M. Involvement of NTS2 receptors in stress-induced analgesia / G. Roussy, K. Belleville, H. Maeno, N. Beaudet, K. Wada, P. Sarret // *Neuroscience.* – 2010. – Vol. 166. – P. 639– 652.
64. Li, X. M. Neuromedin N is a potent modulator of dopamine D2 receptor agonist binding in rat neostriatal membranes / X. M. Li, U. B. Finnman, G. von Euler, P. B. Hedlund, K. Fuxe // *Neurosci Lett.* – 1993. - Vol. 155. – P. 121– 124.
65. Liu, J. L. Effects of repeated electroacupuncture on beta-endorphin and adrenocorticotrophic hormone levels in the hypothalamus and pituitary in rats with chronic pain and ovariectomy / J. L. Liu, S. P. Chen, Y. H. Gao, F. Y. Meng, S. B. Wang, J. Y. Wang // *Chin. J Integr. Med.* – 2010. – Vol. 16. – P. 315– 323.
66. Liu, X. Molecular modeling studies to predict the possible binding modes of endomorphin analogs in mu opioid receptor / X. Liu, M. Kai, L. Jin, R. Wang // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2009. – Vol. 19. – P. 538– 539.
67. Lü, B. C. Endomorphin 1- and endomorphin 2-containing neurons in nucleus tractus solitarii send axons to the parabrachial nuclei in the rat / H. Li, T. Chen, F. Q. Huo, T. Zhang, Y.Q. Li // *Anat. Rec. (Hoboken).* – 2009. – Vol. 292. – P. 488– 497.
68. Lublin, A. Isolation and characterization of the gene encoding the type 5 mouse (*Mus musculus*) somatostatin receptor (msst(5)) / A. Lublin // *Gene.* – 1997. – Vol. 195. – P. 63– 66.

69. Makletsova, M. G. Effect of delta sleep-inducing peptide on macromolecule biosynthesis in brain tissue of stressed rodents / M. G. Makletsova, I. I. Mikhaleva, I. A. Prudchenko, G.T. Rikhireva // Bull. Exp. Biol. Med. – 2006. – Vol. 141. – P. 416– 419.

70. Meilandt, W. J. Enkephalin elevations contribute to neuronal and behavioral impairments in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease / W. J. Meilandt, G. Q. Yu, J. Chin, E. D. Roberson, J. J. Palop, T.Wu, K. Scearce-Levie, L. Mucke // J Neurosci. – 2008. – Vol. 28. – P. 500– 501.

71. Mitchell, J. D. Expression and vasoconstrictor function of anorexigenic peptides neuromedin U-25 and S in the human cardiovascular system / J.D. Mitchell, J. J. Maguire, R. E. Kuc, A. P. Davenport // Cardiovasc Res. – 2009. – Vol. 81. – P. 353– 361.

72. Moody, T. W. Bombesin-like peptides and associated receptors within the brain: distribution and behavioral implications / T. W. Moody, Z. Merali // Peptides. – 2004. – Vol. 25. – P. 511– 520.

73. Mor, A. Isolation of dermenkephalin from amphibian skin, a high-affinity delta-selective opioid heptapeptide containing a D-amino acid residue / A. Mor, A. Delfour, S. Sagan, M. Amiche, P. Pradelles, J. Rossier, P. Nicolas // FEBS Lett. – 1989. – Vol. 255. – P. 269– 274.

74. Mousa, S. A. Involvement of the peripheral sensory and sympathetic nervous system in the vascular endothelial expression of ICAM-1 and the recruitment of opioid-containing immune cells to inhibit inflammatory pain / S. A. Mousa, M. Shaqura, U. Brendl, M. Al-Khrasani, S. Fürst, M. Schäfer, // Brain Behav Immun. – 2010. – Vol. 24. – P. 1310– 1323.

75. Nakahara, K. Comparison of feeding suppression by the anorexigenic hormones neuromedin U and neuromedin S in rats / K. Nakahara, T. Katayama, K. Maruyama, T. Ida, K. Mori, M. Miyazato, K. Kangawa, N. Murakami // J Endocrinol. – 2010. – Vol. 207. – P. 185– 193.

76. Nath, R. Processing of Cdk5 activator P35 to Its truncated form (P25) by calpain in acutely injured neuronal cells / M. Davis, A. W. Probert, N. C.

Kupina, X. D. Ren, G. P. Schielke, K. K. W. Wang // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2000. – Vol. 274. – P. 16– 21.

77. Nishikawa, H. A Role for Corticotropin-Releasing Factor in Repeated Cold Stress-Induced Anxiety-Like Behavior during Forced Swimming and Elevated Plus-Maze Tests in Mice / H. Nishikawa, T. Hata, E. Itoh, Y. Funakami // Biol. Pharm. Bull. – 2004. – Vol. 27. – P. 352– 356.

78. Orskov, C. Complete sequences of glucagon-like peptide-1 from human and pig small intestine / C. Orskov // J Biol Chem. – 1989. – Vol. 264. – P. 128– 129.

79. Pomfrett, C. J. Delta sleep-inducing peptide alters bispectral index, the electroencephalogram and heart rate variability when used as an adjunct to isoflurane anaesthesia / C. J. Pomfrett, S. Dolling, N. R. Anders, D. G. Glover, A. Bryan, B. J. Pollard // Eur. J Anaesthesiol. – 2009. – Vol. 26. – P. 128– 134.

80. Pritchard, L. E. Neuropeptide Processing and Its Impact on Melanocortin Pathways / L. E. Pritchard, A. White // Endocrinology. – 2008. – Vol. 148. – P. 420– 424.

81. Pshezhetsky, A. V. Direct affinity purification and supramolecular organization of human lysosomal cathepsin A / A. V. Pshezhetsky, M. Potier // Arch. Biochem. Biophys. – 1994. – Vol. 313. – P. 64– 70.

82. Rodriguez, A. E. Associations between plasma ghrelin levels and body composition in end-stage renal disease: a longitudinal study / R. Pecoits-Filho, O. Heimbürger, B. Lindholm, L. Nordfors, P. Stenvinkel // Nephrol. Dial. Transplant. – 2004. – Vol. 19. – P. 421– -246.

83. Romani, J. D. Importance of stimulation of the adrenal cortex by delayed action ACTH during prolonged prednisone therapy // Concours Med. – 1958. – Vol. 80. – P. 420– 427.

84. Rose, J. B. Neuropeptide Y Fragments Derived from Neprilysin Processing Are Neuroprotective in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease / J. B. Rose, L. Crews // Journal of Neurosci. – 2009 – Vol. 29. – P. 111– 112.

85. Saito, D. Gonadotropin-releasing hormones modulate electrical activity of vasotocin and isotocin neurons in the brain of rainbow trout / D. Saito, Y. Hasegawa // *Neurosci. Lett.* – 2003. – Vol. 351. – P. 107– 110.

86. Sakamoto, F. Centrally administered orexin-A activates corticotropin-releasing factor-containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus and central amygdaloid nucleus of rats: possible involvement of central orexins on stress-activated central CRF neurons / F. Sakamoto, Y. Ueta // *Regul. Pept.* – 2004. – Vol. 118. – P. 183– 191.

87. Sakoori, K. Central administration of nociceptin/orphanin FQ blocks the acquisition of conditioned place preference to morphine and cocaine, but not conditioned place aversion to naloxone in mice / K. Sakoori, N. P. Murphy // *Psychopharmacology.* – 2004. – Vol. 172. – P. 129– 136.

88. Shioda, S. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide: a novel regulator of vasopressin-containing neurons // *Brain Res.* – 1997. – Vol. 765. – P. 81– 90.

89. Ushikai, M. Centrally administered urocortin 3 inhibits food intake and gastric emptying in mice / M. Ushikai, A. Asakawa, T. Sakoguchi, C. Tanaka // *Endocrine.* – 2010. – Vol. 11. – P. 5– 11.

90. Wang, J. Tree shrew models: a chronic social defeat model of depression and a one-trial captive conditioning model of learning and memory / J. Wang, Q. X. Zhou, M. Tian, Y. X. Yang, L. Xu // *Dongwuxue Yanjiu.* – 2011. – Vol. 32. – P. 24– 30.

91. Zádori, Z. S. Nocistatin and nociceptin given centrally induce opioid-mediated gastric mucosal protection / Z. S. Zádori, N. Shujaa, L. Köles, K.P. Király, K. Tekes, K. Gyires // *Peptides.* – 2008. – Vol. 29. – P. 225– 226.

92. Zeller, E. Peptidases of the nervous system / E. Zeller // *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta.* – 1945. – Vol. 3. – P. 47– 48.

93. Zhao, W. Brain Insulin Receptors and Spatial Memory / W. Zhao // *Journal of Biological Chemistry.* – 1999. – Vol. 274. – P. 3489– 3490.

94. Zhao, Y. An association study between the genetic polymorphisms within GnRHI, LH β and FSH β genes and central precocious puberty in Chinese girls / T. Chen, Y. Zhou, J. Xiao // *Neurosci Lett.* – 2010. – Vol. 486. – P. 188–192.

95. Ziegler, S. G. Low luteinizing hormone enhances spatial memory and has protective effects on memory loss in rats / S. G. Ziegler, J. E. Thornton // *Horm Behav.* – 2010. – Vol. 58. – P. 705–713.

96. Zou, K. Angiotensin-converting enzyme converts amyloid beta-protein 1-42 (Abeta(1-42)) to Abeta(1-40), and its inhibition enhances brain Abeta deposition / H. Yamaguchi, H. Akatsu, T. Sakamoto, M. Ko, K. Mizoguchi, J. S. Gong, W. Yu, T. Yamamoto, K. Kosaka, K. Yanagisawa, M. Michikawa // *J Neurosci.* – 2007. – Vol. 27. – P. 862–863.

97. Zubrzycka, M. Effect of tooth pulp and periaqueductal central gray stimulation on the expression of genes encoding the selected neuropeptides and opioid receptors in the mesencephalon, hypothalamus and thalamus in rats / M. Zubrzycka, A. Janecka // *Brain Res.* – 2011. – Vol. 1382. – P. 19–28.

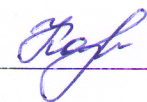
МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических
и естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки
06.04.01 Биология
Магистерская программа
«Биохимия и молекулярная биология»

Утверждаю:
Зав. кафедрой
 Г.А. Карпова
« 10 » 11 2015 г.

Задание

По ВКР студента Абрамочкиной Надежды Дмитриевны

Тема работы: «Изучение молекулярных механизмов действия синтетических пептидных препаратов».

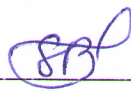
Утверждена приказом по Университету от « 30 » сентября 2015 г. № 1168/0

Срок сдачи студентом законченной работы « 22 » мая 2017 г.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН ВКР

№ п/п	Перечень подлежащих разработке вопросов:	Сроки выполнения этапов	Примечания
1	Подготовка лабораторных белых крыс к проведению научной работы	Декабрь 2015 – Март 2016	Выполнено
2	Проведение опытов по изучению молекулярных механизмов действия синтетических пептидных препаратов	Март 2016-Сентябрь 2016	Выполнено
3	Оформление и обработка экспериментальных данных	Сентябрь 2016 - Декабрь 2016	Выполнено
4	Написание обзора литературы и главы «Методы исследований», написание главы «Результаты исследований и их обсуждение»	Декабрь 2016- Апрель 2017	Выполнено
5	Написание ВКР. Оформление ВКР и представление в комиссию для защиты	Апрель- Июнь 2017	Выполнено

Дата выдачи задания «10» ноября 2015 г.

Руководитель  В.Б. Соловьев

Задание принял к исполнению 