

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Пензенский педагогический институт им. В.Г. Белинского

Факультет
физико-математических и естественных наук

Кафедра
«Зоология и экология»

Направление подготовки

06.03.01 «Биология»

Профиль

«Биоэкология и биохимия»

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

на тему:

**«ВЛИЯНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ПОРАЖЕНИЙ МОЗГА НА
АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМЕННЫХ ФЕРМЕНТОВ ОБМЕНА
РЕГУЛЯТОРНЫХ НЕЙРОПЕПТИДОВ»**

Студент

Зотова Елена Сергеевна

Руководитель

Кручинина А.Д.

Нормоконтролёр

Быстракова Н.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от _____ № ____)

Заведующий кафедрой

Титов С.В.

Работа защищена с отметкой _____ (протокол заседания ГЭК от _____ № ____)

Секретарь ГЭК

Быстракова Н.В.

Пенза 2025

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	5
1.1. Органические поражения головного мозга: этиология, классификация, патогенез.....	5
1.2. Биохимические основы функционирования нейропептидных систем.....	13
1.2.1. Нейропептиды.....	13
1.2.2. Классификация и синтез нейропептидов.....	14
1.3. Работа нейропептидов при органических поражениях мозга.....	18
1.4. Характеристика изученных протеаз.....	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	23
2.1. Объект и предмет исследования.....	23
2.2. Методы определения ферментативной активности.....	23
2.2.1. Определение активности катепсина D.....	23
2.2.2. Определение активности лизинкарбоксипептидазы.....	24
2.2.3. Определение активности пептидил-дипептидазы A.....	24
2.2.4. Определение концентрации белковых молекул методом Лоури.....	25
2.2.5. Нингидриновый метод.....	26
2.3. Статистическая обработка данных.....	27
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	28
3.1. Размер экспериментальной выборки.....	28
3.2. Калибровочные прямые.....	28
3.3. Основные результаты по определению активности плазменных протеаз.....	31
3.3.1. Активность лизинкарбоксипептидазы.....	31
3.3.2. Активность катепсина D.....	33
3.3.3. Активность пептидил-дипептидазы A.....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	40
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	41

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Одной из важнейших проблем современной нейробиологии и неврологии в частности являются органические поражения мозга. Зачастую они значительно ухудшают качество жизни и требуют повышенного внимания и интенсивного лечения, иногда даже консервативного. К данной патологии относят разнообразные нарушения в структуре мозговой ткани, возникшие вследствие травм, инфекций и других внешних или внутренних причин. По статистике Всемирной Организации Здравоохранения около 35% населения сталкиваются с этой проблемой в течении жизни; за год регистрируется приблизительно 50-70 тысяч случаев (Официальный сайт...). Отмечается тенденция роста заболевающих, особенно среди лиц пожилого возраста.

Органические поражения мозга влияют на многие системы органов, в том числе на нейроэндокринную. Нейропептиды играют значительную роль в организме человека: участвуют во многих обменных процессах, восстановительных, в регулировании настроения, циклических ритмов, влияют на память, концентрацию, внимание и даже на социализацию в обществе. Известно, что концентрация нейропептидов, а следовательно практически все биохимические процессы нервной ткани, в регуляции которых они участвуют, сильно зависят от активности протеолитических ферментов, в том числе их плазменных форм. Они участвуют в их процессинге, активации и утилизации. Характер работы подобных ферментных систем значительно изменяется при органических нарушениях мозга как в сторону чрезмерной активации, в таком случае происходит повышенное протеолитическое расщепление нейропептидов, так и в сторону ингибирования, что приводит к повышенной активности регулируемых нейропептидами систем, процессинг которых нарушен. Такая дерегуляция работы сигнальных систем приводит к замедлению восстановления клеток, что в свою очередь увеличивает интенсивность повреждения мозговой ткани.

Более глубоко поняв механизмы регуляции пептидергических систем и влияние на их работу соответствующих протеолитических ферментов, можно открыть новые пути диагностики и лечения органических поражений мозга. Например, станет возможным использовать определённые нейропептиды в качестве ранних предикторов патологических изменений в нервной ткани, что позволит провести более мягкое лечение с высокими шансами на успешное восстановление утраченных функций или вообще предотвратить заболевание. Помимо этого, станет возможным разработка новых типов лекарственных препаратов, направленных на нормализацию биохимических процессов, происходящих в нервной системе.

Цель работы: установить связь между органическими поражениями мозга и активностью плазменных протеолитических ферментов: катепсина D, лизинкарбоксипептидазы и пептидил-дипептидазы А.

Задачи:

1. Провести анализ современных литературных данных по теме исследования.
2. Определить активность лизинкарбоксипептидазы, катепсина D и пептидил-дипептидазы А в плазме крови здоровых людей и больных органическими поражениями мозга.
3. Обработать полученные данные, на их основе сделать выводы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Органические поражения головного мозга: этиология, классификация, патогенез

Органические поражения головного мозга — это изменения структуры и функций мозга, вызванные физическими, химическими или биологическими воздействиями.

Первоначально этот термин был создан для того, чтобы отличать физические (называемые «органическими») причины психических расстройств от психиатрических (называемых «функциональными») расстройств. Органическая причина дисфункции мозга подозревается, когда нет указаний на четко определенную психиатрическую или «неорганическую» причину, например как расстройство настроения или другие нетравматические поражения нервной ткани или нарушения её биохимического равновесия. (Крепелин, 2000)

Органические поражения мозга могут возникнуть двумя путями:

- 1) *Во время беременности матери* (врожденные причины).

Причинами становятся: инфекции, приём токсичных или лекарственных веществ, злоупотребление алкоголем, курение, воздействие ионизирующего излучения, кислородное голодание плода, затяжные роды, преждевременная отслойка плаценты, атония матки, сильные стрессы и другое.

Вследствие этих факторов у плода и новорождённого возникают гипоксические повреждения головного мозга, которые приводят к минимальной дисфункции мозга (Govindarajan et al, 2015). Повреждения в основном имеют венозный инфарктный характер. У недоношенных детей повреждения затрагивают в первую очередь перивентрикулярные отложения зародышевой ткани. У доношенных детей потери происходят в основном в коре головного мозга. Выделяют также и подострые повреждения, представляющие собой переходную стадию между острыми повреждениями

головного мозга у новорождённых и хроническими повреждениями при минимальной дисфункции мозга. Встречается как у детей, так и у взрослых. (Прусаков и др, 2010)

2) *Нарушения при жизни человека (приобретенные причины).*

Они появляются вследствие каких-либо негативных факторов. К ним относятся инфекционные заболевания, травмы, наследственные заболевания и/или нейродегенеративные заболевания, сосудистые заболевания, вызванные злоупотреблением алкоголем, токсичными или лекарственными веществами и другими факторами внешней среды (Сычёва и др., 2015).

Существует несколько вариантов классификации органических поражений мозга:

1) По степени тяжести

– легкая степень: поражено 5-20 % ткани мозга. Не имеет сильного влияния на жизнь человека, поэтому не требует немедленного медицинского вмешательства. Встречается у большого количества людей, проявляется как небольшая отсталость в развитии, но все равно есть возможность без особых проблем социализироваться в обществе. К симптомам относится: плохое усваивание и хранение информации в памяти (гипомнезия), снижение концентрации внимания при обучении, обстоятельное мышление (излишнее детализирование, добавление несуществующих вещей), возможны частые головные боли, нарушение сна.

– средняя степень: поражено 20-50 % ткани мозга. Требуется медицинского вмешательства, так как происходит значительное нарушение деятельности нервной системы. Симптомы сходны с поражением легкой степени, но проявляются активнее и мешают полноценной социализации в обществе. К ним относятся сложности с обработкой, запоминанием и хранением информации, планированием деятельности, снижение внимания, повышенная отвлекаемость. Также наблюдается небольшое нарушение речи, особенно в моменты волнения, трудности с формулировкой предложений и

подбором слов. В эмоциональном плане наблюдается снижение контроля над эмоциями, возникают резкие перепады настроения, свойственна импульсивность, плаксивость, апатия, возникает тревожность, мнительность. Возможно возникновение частых приступов головокружения и нарушения координации. В случае со средней степенью органического поражения ткани мозга в ходе лечения возможно достичь значительного улучшения и долгосрочной блокировки симптомов.

– тяжелая степень: поражено 50-70 % ткани мозга. Требуется немедленного медицинского вмешательства, так как в этом случае наблюдаются тяжелые нервно-психические расстройства. К симптомам относятся нарушение функций речи, восприятия внешнего мира, дезориентация, галлюцинации, возможны параличи, тремор рук, нарушение координации. В эмоциональном плане наблюдаются перепады настроения, апатия, психозы. В таком состоянии человек не способен выполнять какие-либо дела в быту, полностью заботиться о собственной гигиене. Лечение дает лишь кратковременный относительный положительный эффект, наблюдение врача требуется на протяжении всей жизни (Крепелин, 2000).

2) По причине возникновения:

1. Травматические

- Кровоизлияние в мозг
- Кровоизлияние в пространство вокруг головного мозга
- Кровяной сгусток внутри черепа, но за пределами мозга и его оболочки, который может оказывать давление на мозг

- Сотрясение мозга

2. Сосудистые

- Деменция вследствие многочисленных инсультов
- Сердечные инфекции
- Инсульт

3. Дегенеративные расстройства

4. Аутоиммунные заболевания
 - Рассеянный склероз
 - Аутоиммунный энцефалит
5. Метаболические заболевания
 - Заболевание печени
 - Заболевание почек
 - Заболевание щитовидной железы
 - Дефицит витаминов (В₁, В₁₂ или В₉)
6. Токсическое воздействие
 - Интоксикация в результате употребления наркотиков или алкоголя
 - Интоксикация лекарственными препаратами, такие как кортикостероиды, седативно-снотворные, антигистаминные и антидепрессанты
7. Инфекционные
 - Любая внезапно возникшая или длительная инфекция
 - Заражение крови
 - Инфекция головного мозга
 - Менингит
 - Поздняя стадия сифилиса

К нейрочувствительным расстройствам также могут привести онкологические заболевания и последствия противораковой терапии (Лихтерман и др., 2023).

3) По локализации:

- Лобная доля – отвечает за сложное поведение и мышление. В ее функции входит контроль внимания, концентрации, восприятия информации. В речи она участвует в формулировке предложений, контроля интонации, в подборе слов. Также она отвечает за социальные взаимодействия, восприятие эмоций и чувств окружающих, понимание своих ошибок, формировании

стратегии общения. При ее нарушении возникают такие проблемы как апатия, эгоцентризм, неспособность правильно формулировать речь, социальная изоляция (Smith et al, 2020).

- Височная доля является важным связующим звеном между памятью, сенсорным восприятием мира и эмоциями. Помогает в обработке слуховой информации, определение места нахождения звука, восприятием музыки, эмоциональной окраски голоса собеседника, распознавание смысла речи окружающих. Помимо устной речи, помогает понять и письменную. Также височная доля преобразует кратковременную память в долговременную, формирует пространственную память, фиксирует травматические события и эмоционально значимые. Участвует в распознавании лиц, знакомых мест, создании комплексных представлений (например, распознавание человека по голосу или запаху). При ее поражении возникает нарушение памяти, сложности с восприятием речи, приводит к наличию ложных воспоминаний (височной эпилепсии) (Smith, Johnson. – 2000).

- Теменные доли связывают между собой сенсорные ощущения, движения и мышление. Они обрабатывают тактильные сигналы тела, участвуют в координации движений и регулировки положения тела в пространстве, позволяют узнавать предметы путем прикосновения, участвуют в процессе письма и чтения, связывая символы букв или цифр с их значением. При нарушении их функций возникает неспособность писать, читать, опознавать предметы сенсорным путем, также человек не различает понятия право и лево, нарушается координация в пространстве.

- Затылочные доли отвечают за обработку зрительной информации, превращение световых сигналов в осознанные образы. В зависимости от определённой части затылочной доли, ею выполняются такие функции, как восприятие цвета, узоров, символов, формирование «первичной» картинки. Также помогают в распознавании лиц, границ и линий, участвуют в пространственной ориентации. При органическом повреждении мозга

возникает дальтонизм, неспособность узнавать предметы и лица при сохраненном зрении, отсутствие восприятия движущихся предметов, искажение зрительной информации об окружающем мире, также возможны зрительные галлюцинации.

- Подкорковые структуры отвечают за физиологические процессы в организме, регулируют движение, память и эмоции. Органические поражения мозга влияют на такие структуры как: таламус, гипоталамус и базальные ганглии.

а) Таламус отвечает за регуляцию сознания, двигательных функций, эмоций, а также передает сигналы от органов чувств к коре больших полушарий. В состав таламуса входят ядра, отвечающие за разный тип восприятия сенсорной информации (кроме обоняния). Он контролирует запоминание жизненно важных ощущений (например, боль), позволяет отделять нужную информацию от ненужной. Таламус участвует в регуляции сознания и циклов сна и бодрствования, отключает двигательные системы во время сна, координирует точность движения. Отвечает за формирование кратковременной памяти и эмоциональных реакций. При органических поражениях наблюдается нарушения восприятия сенсорных ощущений, восприятия боли, может появиться ложный болевой синдром. Также снижается разделение информации из окружающей среды, может начаться бессонница, либо постоянная сонливость. Нарушается двигательный контроль, появляется тремор или болезнь Паркинсона. Возникают сложности с хранением информации, так как кратковременная память не формируется.

б) Гипоталамус — отдел промежуточного головного мозга, отвечающий за регуляцию гомеостаза, некоторых поведенческих функций и эндокринной системы. Является связующим звеном между эндокринной и нервной системой. В его функции входит поддержание внутреннего постоянства организма (терморегуляция, водно-солевой баланс), контроль чувств насыщения и голода. Одной из важнейших его функция является контроль

эндокринной системы. В этот аспект входит синтез гормонов, регулирующих работу гипофиза (например кортизол, окситоцин), активация симпатoadреналовую систему в моменты стресса (выброс адреналина в кровь), контроль выработки мелатонина, влияющего на состояние сна и бодрствования. Также он влияет на симпатическую и парасимпатическую системы, отвечающие за стресс и отдых. Гипоталамус связан с лимбической системой и участвует в регуляции эмоций и поведения. При нарушении его функций вследствие поражения мозговой ткани возникают нарушения в выработке гормонов, приводящих к различным психическим и неврологическим заболеваниям. У человека могут появиться такие симптомы как панические атаки, апатия, тревожность, бессонница или ожирение.

в) Базальные ганглии являются подкорковыми ядрами, отвечающие за контроль движений, эмоций и восприятия окружающей среды. Эти структуры помогают в регуляции точности движений, тонуса мышц, формирования мышечной памяти. Они участвуют в выборе стратегии социализации, планировке дальнейших действий, играют ключевую роль в обучении, формировании мотивации и привычек. При нарушении их работы возможны перепады настроения, депрессия, непроизвольные вздрагивания, тремор, тревожность, а также развитие обсессивно-компульсивного расстройства.

- Ствол мозга выполняет регулировку жизнеобеспечивающих функций, таких как дыхание, работа сердечно-сосудистой системы, передача сенсорных сигналов в таламус и кору головного мозга, мимические движения, участие в координации положения тела, а также является связующим звеном между головным мозгом и спинным. Отделы ствола мозга:

а) Продолговатый мозг — нижний отдел ствола мозга. Там находятся центры вдоха и выдоха, центр регулировки сердечно-сосудистой системы, центр вегетативных рефлексов (глотание, кашель, чихание), он участвует в

движениях головы, регуляции произвольных движений. Без экстренного медицинского вмешательства его повреждения могут привести к летальному исходу (Геренг и др., 2022).

б) Мост (Варолиев мост) выполняет связывающую функцию между корой головного мозга, мозжечком и продолговатым мозгом при помощи поперечных волокон. Как и продолговатый мозг, мост участвует в регуляции дыхания, контролирует мышцы лица, слух, равновесие, движение глаз. Повреждение приводит к шаткости походки, параличу лицевых мышц и ухудшению зрения и слуха.

в) Средний мозг, в отличие от моста, участвует в работе зрительной и слуховой систем, является частью дофаминергической системы. В его состав входят верхние холмики, отвечающие за восприятие зрительных сигналов, и нижние холмики, отвечающие за восприятие слуховых сигналов. В среднем мозге также находится черная субстанция, вырабатывающая дофамин и передающая его в полосатое тело. Также она регулирует контроль произвольных движений, через дофаминергическую систему влияет на формирование мотивации, обеспечивает работу системы «вознаграждения». Органические поражения мозговой ткани приводят к тяжелым зрительным, двигательным и психическим нарушениям: к тремору, нарушению в работе глазодвигательных мышц и другим серьезным последствиям.

- Мозжечок — отдел головного мозга, отвечающий за точность движений. Он координирует совместную работу мышц, поддерживает равновесие, регулирует стабильность положения тела при движении, тонус мышц и участвует в формировании мышечной памяти. При его поражении наблюдается шаткость походки, неспособность сохранять устойчивое положение тела, тремор, а также появляются проблемы с речью, ее замедление и отрывистость (Геренг и др., 2022).

1.2. Биохимические основы функционирования нейропептидных систем

1.2.1. Нейропептиды

Нейропептиды – группа олигопептидов, образующихся в центральной нервной системе. По строению являются короткими цепочками аминокислот, как правило, от 2 до 50 аминокислотных остатков, по большей части линейные пептиды. Если же в цепочке более 100 аминокислотных остатков, то их уже относят к регуляторным белкам. Синтез и процессинг таких регуляторных пептидов происходит по механизму ограниченного протеолиза, заключающегося в ферментативном расщеплении препро- и пропептидов по специфическим последовательностям аминокислот, причём каждый субстрат имеет свою функциональную активность. Нейропептиды находятся как в тонких миелинизированных волокнах А-дельта, так и в немиелинизированных волокнах С типа (Иванов, Петрова, 2020).

Нейропептиды выполняют чрезвычайно разнообразные функции, однако одной из самых важных является управление передачей сигнала клеткой, контролируя выработку других сигнальных молекул, например, нейромедиаторов или цитокинов. Вместо того чтобы воздействовать на клетки-мишени точно, нейропептиды действуют на регуляторные системы комплексно. Обеспечивая порядок в сложных биохимических процессах, они предотвращают разрушение молекулярных взаимодействий и поддерживают нормальную работу клеток (Дорогина, 2019).

Нейропептиды вырабатываются при изменениях внутренней среды организма, тем самым активирует выработку других пептидов. Помимо этого, они могут участвовать в эндокринной регуляции, регулируя выработку гормонов, оказывая как стимулирующее действие, так и тормозящее, помогают подстроить обмен веществ под нужды организма. Эти вещества контролируют многие процессы в нервной системе: циркадные ритмы,

восприятие сенсорных сигналов, пролиферацию и апоптоз клеток глии и т. д. (Мэйнс, Эйппер, 1999)

Нейропептиды участвуют также в работе иммунной системы, влияя на выделение и репертуар цитокинов, как увеличивая, так и уменьшая интенсивность воспалительных реакций. Также они регулируют тканевый метаболизм, например, модулируя уровень усвоения глюкозой тканями, стимулируют или замедляют синтез АТФ, участвуют в приспособлении организма к стрессу и другим нагрузкам, регулируют митотический цикл клеток, регулируя интенсивность апоптоза и пролиферации (Хёкфельт и др., 2003).

Функционально нейропептиды практически всегда связаны с одним или несколькими классическими нейромедиаторами. Например, антагонисты вещества Р влияют на тяжесть проявления симптомов депрессии, традиционно связанной с нарушением характера работы дофаминергической системы. Нарушения в работе пептидергических систем затрагивают приводят к нарушению работы других регуляторных систем организма, появлению метаболических заболеваний (например, диабет), ускоренному старению клеток и организма. Таким образом можно заключить, что нейропептиды играют важную роль в организме, и данные о механизме работы пептидергических систем могут быть использованы для разработки новых методик лечения (Сычёва и др, 2015).

1.2.2. Классификация и синтез нейропептидов

Традиционно нейропептиды классифицируют по месту их синтеза и действия.

1) Гипоталамические высвобождающие факторы

Данные нейропептиды также называются либеринами и статинами, так как они регулируют выработку гипофизарных гормонов, стимулируя или тормозя ее. Через влияние на секрецию гипофизарных гормонов эти нейропептиды контролируют не только базовые физиологические процессы,

такие как пищевое поведение, циркадные ритмы, поддержание гомеостаза, но также играют роль в реализации социального поведения человека.

Их синтез начинается в нейронах ядер гипоталамуса, после чего аксонным транспортом они выделяются в кровеносные капилляры, и уже по системе воротных вен поступают в переднюю долю гипофиза, где реализуется их эффект.

Несмотря на то, что гипоталамические нейропептиды имеют чёткую направленность, их действие многогранно. Например, соматостатин подавляет действие гормона роста, но также влияет на процессы пищеварения (Чайлдс и др., 1991).

Для нормальной работы организма необходим баланс между активностью либеринов и статинов, а в случае его нарушения происходит дерегуляция и патологические сдвиги в работе систем органов.

2) Тахикинины

Эти нейропептиды способны влиять на различные физиологические процессы. Например, они способны вызвать у млекопитающих гипотонию, в пищеварительном тракте регулируют сжатие е гладкой мускулатуры кишечника и мочевого пузыря, а также усиливают слюноотделение. Их синтез начинается с крупных белков-предшественников, называющиеся препротахикининами, которые в процессе ограниченного протеолиза под действием пептидаз расщепляются на более мелкие активные нейропептиды.

Наиболее известным представителем этой группы является вещество Р. Это первый изученный нейропептид, функционирующий так же как и нейромедиатор. Среди его функций есть передача нервных импульсов, участие в развитии реакций воспаления, контроль мышечной активности и т.д. (Лелевич, 2021)

3) Опиоидные нейропептиды

Опиоидные нейропептиды вырабатываются в ЦНС и в различных железах внутренней секреции по всему телу, например надпочечниками и

гипофизом. Их эффекты аналогичным растительным опиатам — морфину и героину. Эндогенные опиоидные пептиды, которые служат нейромодуляторами, действуют в головном и спинном мозге, регулируя действие других нейромедиаторов. Опиоидные нейропептиды участвуют в развитии чувства эйфории и процессах обезболивания. Их действие реализуется через опиоидные рецепторы двух типов. Через δ -рецепторы выполняется влияние на моторные функции организма. Опиоидная система играет большую роль в функционировании внутренней системы подкрепления. Кроме того, эндогенные опиоидные нейропептиды участвуют в регуляции работы иммунной системы. Найдено, что β -эндорфин стимулировал цитотоксические Т-лимфоциты, НК-клетки (естественные киллеры), Т-хелперы и В-лимфоциты (Златник и др, 2018). В лимбической системе, контролирующей регуляцию эмоций, присутствуют высокое содержание энкефалинов (Сергалиева и др., 2023).

4) Панкреатические пептиды (нейропептиды поджелудочной железы)

Нейропептиды этой группы принимают участие в регулировании секреторной функции поджелудочной железы, выделении инсулина. Связаны с нервной системой с помощью блуждающего нерва (ось «мозг-кишечник»), также участвуют в контроле тревожности, настроения и стрессоустойчивости, аппетита и потребления пищи, считаются ключевыми факторами в развитии ожирения (Рыжкова и др., 2022).

5) Вазопрессин и окситоцин

Эти нейропептиды синтезируются в крупноклеточных нейронах супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса, затем по аксонам транспортируются в заднюю долю гипофиза, где накапливаются и в итоге выходят в кровоток для регулирования гомеостаза электролитов, воды и сосудистого тонуса. Окситоцин играет ключевую роль в процессе родов, стимулируя сокращение матки и выделение пролактина. Вазопрессин

необходим для сердечно-сосудистого гомеостаза, используется для лечения шоковых состояний, связанных с расширением (Авлиякулыева и др., 2024)

6) Бомбезины

Эта группа нейропептидов влияет на различные физиологические процессы, например, терморегуляцию, пролиферацию клеток, сокращение гладкой мускулатуры, участвуют в регуляции пищевого поведения и т. д. (Гонсалес и др., 2008)

7) Кинины

Действие кининов заключается в регуляции болевых ощущений, расширении артериол, участвуют в сокращении мышц и увеличении проницаемости сосудов, воздействуя на эндотелиальные клетки. Свои эффекты передают через рецепторы, связанные с G-белками. Воздействуя через аксоны, они блокируют нервные импульсы, что приводит к расслаблению мышц. Принимают участие в активации иммунной системы, действуя как медиаторы воспалительных реакций. Если их активность снижается, это приводит к задержке натрия, сужению стенок сосудов, что приводит к повышению артериального давления. Вырабатываются в поврежденных тканях организма, содержатся в крови и моче человека. Кинин-калликреиновая система, звеньями которой являются, например, брадикинин и каллидин, участвуют в регуляции артериального давления, индуцируя вазоконстрикцию (Третьякевич и др., 2013).

Нейропептиды образуются в секреторных клетках через последовательность ферментативных реакций, которая включает в себя несколько стадий:

- 1) Трансляция и первичный синтез – происходит на рибосомах.
- 2) Посттрансляционные изменения:
 - а) Расщепление под действием ферментов
 - б) Химическая модификация (карбкосилирование, ацилирование, сульфатирование, гликозилирование и т. д.)

в) Сортинг и транспортировка

Процессинг нейропептидов важен для перехода нейропептидов в активную форму, для регуляции выброса их к месту назначения, для точного действия на определенные рецепторы.

При нарушении их синтеза происходят сбои в работе многих систем, например эндокринной, нервной, иммунной.

1.3. Работа нейропептидов при органических поражениях мозга

Большинство нейропептидов в норме заканчивают процессинг в аппарате Гольджи, откуда они транспортируются из тела нейронов в аксоны, но при появлении физиологических изменений в мозге эти процессы нарушаются. Существует ограниченное количество данных о роли нейропептидов в формировании органических поражений мозга, а также о характере изменения работы пептидергических систем при таких патологиях. Однако известно, что при повреждении мозговой ткани нейропептиды участвуют в активации защитных механизмов. Например, они помогают регенерировать поврежденные участки нервных волокон и обладают нейропротекторным действием в отношении здоровых нейронов. Нейрозащитный механизм заключен в нескольких действиях: улучшение кровоснабжения очага патологии, укрепление внешних оболочек нервных клеток, стабилизация пластического и энергетического обмена нейронов (Holmes et al, 2003).

Наиболее изучена роль определённых нейропептидов в патогенезе болезни Альцгеймера (Тепляшина и др., 2020.). Экспериментально показаны нарушения в работе пептидергических систем, ключевыми звеньями которых являются нейротензин, гресин, субстанция Р, орексин и некоторые другие нейропептиды. При болезни Альцгеймера происходит нарушение когнитивных функций организма, в завершающей стадии – деменция. У таких пациентов в мозговой ткани обнаружены наросты, «бляшки», основной компонент которых – бета-амилоидный пептид. Они образуются при

нарушении функции секретаз, которые при нормальной работе расщепляют белок предшественник амилоида. В результате накапливаются патогенные фибриллы, в которых больше всего содержится β -амилоида 42. Под его действием разрушаются митохондрии нейронов, происходит дисбаланс кальциевого обмена, подавляется использование глюкозы и действие инсулиновых рецепторов. Помимо β -амилоида, патогенными являются и его растворимые олигомеры. Они обладают большей нейротоксичностью, т. к. повреждают синапсы, тем самым увеличивая интенсивность воспаления нервной ткани и нейродегенерацию (Smith, Johnson, 2000).

При болезни Альцгеймера снижается выработка нейропептида Y, влияющего на аппетит и стресс, проопиомеланокортина, участвующего в обмене веществ, а также агути-подобного пептида, регулирующего чувство голода. Причина заключена в том, что клетки хуже реагируют на инсулин, что подавляет работу нейронов, синтезирующих нейропептиды. Это снижает активность головного мозга, что в последствии приводит к нарушению связи между нервными клетками, а это в свою очередь к нарушению памяти, обменных процессов и мыслительных. Также снижается активность ядерного респираторного фактора, митохондриального транскрипционного фактора A, гамма-коактиватора 1-альфа, участвующих в регуляции митохондриального дыхания (Van den Berghe, 2008).

Многочисленные исследования в области причин и механизма развития Альцгеймера показали, что такие нейропептиды, как нейротензин, грелин, нейропептид Y, вещество P, орексин при нейродегенерации обладают защитным действием:

- Нейропептид Y защищает мембрану клеток от повреждения бета-амилоидом, уменьшает интенсивность оксидативного стресса, увеличивая уровень глутатиона и ингибируя ферменты, производящие свободные радикалы.

- Грелин участвует в регуляции нейроэндокринных и нейродегенеративных процессах, поддержании энергетического гомеостаза. Он способствует снижению уровня бета-амилоида через ингибирование образования супероксидного радикала, деполяризации митохондриальной мембраны и повышения уровня кальция, способствует уменьшению когнитивных нарушений.

- Нейротензин снижает интенсивность патогенетического действия амилоидных пептидов на нервную ткань и помогает восстановить способность к запоминанию и обучению.

- Вещество Р оказывает нейропротекторное действие, повышая активность неамилоидогенной α -секретазы. Также найдено, что концентрация вещества Р при болезни Альцгеймера в спинном мозге повышается, но уменьшается в коре головного мозга, гиппокампе и полосатом теле (Тепляшина и др., 2020).

1.4. Характеристика изученных протеаз

Пиптедил-дипептидаза А

Фермент из класса сериновых экзопептидаз. Основная функция: отщепление N-концевых аминокислот у белков, у которых в составе есть пролин или аланин. Существует в двух формах:

- Мембраносвязанная – находится на поверхности клеток (кишечных, иммунных, нервных). Играет ключевую роль в воспалительных процессах. Эта форма пиптедил-дипептидазы А расщепляет воспалительные хемокины, усиливает сигнал от рецептора Т-клетки, стимулирует иммунный ответ, а также способствует к прикреплению иммунных клеток к эндотелию (King et al, 1991).

- Растворимая – находится в биологических жидкостях, например в плазме крови. Образуется из мембраносвязанной формы через процессы шединга. В ее функции входит ингибирование секреции инсулина, связывание с рецепторами иммунных клеток.

Пептидил-дипептидаза А участвует в регуляции секреции гормонов (например, инсулина), иммунного ответа, контроля уровня нейропептидов (например, нейропептид Y) (Левильер и др., 1970).

При органических поражениях мозга пептидил-дипептидаза А расщепляет провоспалительные пептиды, тем самым снижая нейрогенное воспаление, уменьшает проницаемость мембраны, способствует сохранению нейропептида Y (Маклахлан и др., 2022).

Катепсин D

Является аспарагиновой эндопротеазой, находящейся в лизосомах. Основная функция: активация биоактивных белков прелизосомальных компартментах (Димент и др., 1989) и денатурация белков. Оптимальный уровень pH для него составляет 4,5-5,0.

Неактивный предшественник катепсина D синтезируется в гранулярном эндоплазматическом ретикулуме. Позже в аппарате Гольджи происходит добавление олигосахаридов для дальнейшей его транспортировки в место его основного нахождения – лизосомы. Под действием pH менее 7 и с помощью других катепсинов (например B), катепсин вначале переходит в промежуточную форму, а затем в полностью активный фермент. В норме находится только в лизосомах, при патологии может быть во внеклеточном пространстве (Lynn, White, 2007)

Ингибитором является пепстатин А.

При нейродегенеративных заболеваниях участвует в разрушении нейропептидов и нейронов (например при болезни Альцгеймера), активирует протеолитические ферменты, участвует в иммунном ответе организма, при патологиях разрушает матрикс, тем самым способствуя разрастанию метастаз (Хоссейн и др., 2021).

Лизинкарбоксипептидаза

Фермент, относящийся к классу экзопептидаз. Основная функция: отщепление лизина от С-концов белка. В активном центре содержит ион цинка. В организме может находиться в двух формах, в зависимости от места синтеза и выполняемой функции (Скидгель, Эрдёс, 2007).

1) Плазменная - синтезируется в печени, после чего попадает в ток крови. При повреждении тканей организма и наличия кровотечения, фермент активируется тромбином, отщепляет лизин с конца белка фибрина, тем самым снижая воспаление и замедляя разрушение тромбов. Также в его функции входит регулировка работы брадикинина (Kirstin et al, 2004).

2) Тканевая – отличается местом локализации и функциями. Синтезируется в поджелудочной железе, после чего транспортируется в кишечник, где активируется трипсином. Его функция заключена в расщеплении белков, активации некоторых нейропептидов, через отщепление от их предшественников лизин, а также регуляции уровня гормонов, например инсулина (Randal et al, 1984)

Важна ее роль и при органических поражениях мозга. Лизинкарбоксипептидаза влияет на активацию нейропептидов, болевую чувствительность и, расщепляя субстанцию Р и брадикинин, уменьшает воспаление мозговой ткани (Yamamoto, Saito, 1982).

При болезни Альцгеймера она снижает уровень токсичных белков (например, β -амилоида). Однако, под ее действием стимулируется рост раковых клеток. Лизинкарбоксипептидаза активирует некоторые белки, которые ингибируют разрушение раковых клеток, а также расщепляет пептиды, важные для иммунного ответа, в том числе в нервной ткани (Savaskan et al, 2001).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект и предмет исследования

Объектом исследования являлась плазма крови человека. Образцы были собраны во время проведения производственной практики на базе ГБУЗ «Областная психиатрическая больница им. К.Р. Евграфова», там же была выполнена основная часть экспериментальной работы. В эксперименте был использован биологический материал от здоровых людей (группа сравнения) и пациентов с болезнью Альцгеймера и острым нарушением мозгового кровообращения (опытная группа). Образцы были собраны в вакуумные пробирки с антикоагулянтом (цитрат натрия) и были получены от медицинского персонала — работников диагностической лаборатории — в обезличенном виде и только с указанием пола и возраста пациента.

В образцах плазмы в соответствии с задумкой исследования была определена ферментативная активность катепсина D, лизинкарбоксипептидазы и пептидил-дипептидазы A.

2.2. Методы определения ферментативной активности

2.2.1. Определение катепсина D

Катепсин D имеет рН-оптимум в районе 3,0-4,0 единиц. Субстратом для определения его активности был гемоглобин. Пробы делили на опытные и контрольные, исследование выполняли в трёх повторностях. В обе группы пробирок добавляли 40 мкл исследуемой сыворотки, 120 мкл 100 мМ Na-ацетатного буфера (рН = 3,3), содержащего 0,0015 мМ пепстатина, и прединкубировали в течение 8 мин при 37 °С. Затем в опытные пробирки добавляли 40 мкл 8%-го раствора гемоглобина, и затем все пробирки инкубировали в течение 40 минут при 37 °С. По прошествии времени инкубации в пробирки добавляли 200 мкл 5%-го раствора ТХУ, затем в контрольные — дополнительно 40 мкл 8%-го раствора гемоглобина. Все пробы центрифугировали при 4000 об/мин в течение 30 мин для осаждения высокомолекулярных соединений.

Активность катепсина D определяли по скорости образования низкомолекулярных продуктов гидролиза гемоглобина (определены по тирозину) за 1 мин инкубации на 1 мг белка пробы.

Количество низкомолекулярных продуктов реакции в супернатанте по тирозину и концентрацию белка в пробе определяли методом Лоури с использованием калибровочной прямой, построенной по серии разведений тирозина и БСА соответственно. Концентрация тирозина составляла от 10 до 100 мкг/мл с шагом в 10 мкг/мл, концентрация БСА от 10 до 100 мкг/мл с шагом в 10 мкг/мл (Соловьёв, Генгин, 2012).

2.2.2. Определение активности лизинкарбоксипептидазы

Пробы делили на контрольные и опытные. В опытные пробирки добавляли 40 мкл сыворотки крови, в контрольные — равный объём дистиллированной воды. Затем добавляли 20 мкл 3,5 мМ раствора сульфата кобальта, приготовленного на 100 мМ трис-HCl буфере (pH = 7,6), и прединкубировали в течение 8 мин при 37 °C. После добавляли 10 мкл гиппурил-аргинина, приготовленного на аналогичном трис-HCl буфере, до конечной концентрации в 5 мМ и инкубировали 120 мин при 37 °C. Реакцию останавливали прибавлением 30 мкл 10%-го раствора ТХУ и центрифугировали 30 мин при 4000 об/мин, затем в 50 мкл надосадочной жидкости определяли концентрацию образовавшегося аргинина нингидриновым методом с 1%-м спиртовым раствором нингидрина с использованием калибровочной прямой, построенной по разведениям аргинина. Активность лизинкарбоксипептидазы выражали в нмоль аргинина, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка (Кручинина, 2015).

2.2.3. Определение активности пептидил-дипептидазы А

Пробы делили на опытные и контрольные. В опытные пробирки к 40 мкл плазмы крови добавляли 20 мкл 100 мМ трис-HCl буфера (pH=7,6), а в контрольные к 40 мкл плазмы крови добавляли 20 мкл 35 мМ раствора

каптоприла в 100 мМ трис-НСl буфере (рН=7,6). Пробирки прединкубировали в течение 8 мин при 37 °С, затем добавляли 10 мкл 5 мМ раствора карбоксибензоил-гли-гли-арг, приготовленного на 100 мМ трис-НСl буфере (рН=7,6) и инкубировали при 37 °С в течение 120 мин. Для остановки реакции добавляли 30 мкл 15%-го раствора ТХУ и центрифугировали в течение 30 мин при 4000 об/мин. В 50 мкл надосадочной жидкости определяли содержание гли-арг нингидриновым методом с 1%-м раствором нингидрина. Активность ПДПА выражали в нмоль гли-арг, образовавшегося за 1 мин инкубации на 1 мг белка (Кручинина, 2015).

2.2.4. Определение концентрации белковых молекул методом Лоури

Метод Лоури — количественный спектрофотометрический метод измерения концентрации белка в растворе. Принцип метода состоит в образовании окрашенного комплекса по месту пептидной связи в щелочной среде, включающего в себя ионы меди и сложное комплексное соединение реактива Фолина-Чокалтеу.

Для определения концентрации белковых молекул с помощью метода Лоури были использованы следующие реактивы:

Реактив А. 0,5 г кристаллогидрата сульфата меди + 1 г цитрата натрия на 100 мл дистиллированной воды

Реактив В. 4 г гидроксида натрия + 20 г безводного карбонат натрия на 1000 мл дистиллированной воды.

Реактив С. Смесь реактива В и А в соотношении 50:1

Реактив Фолина-Чокалтеу. 1 н раствор Фолина-Чокалтеу.

В пробирках смешивали равные объёмы исследуемых растворов и реактива С, после чего перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Затем добавляли реактив Фолина-Чокалтеу в объёме 1/10 от общего объёма смеси, перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 40 мин. Пробы колориметрировали на спектрофотометре при длине волны 750 нм. Холостая проба содержала те же

компоненты, только вместо исследуемого раствора был добавлен такой же объём дистиллированной воды (Соловьёв, Генгин, 2012).

Количественное определение концентрации белковых молекул проводили с использованием метода калибровочной кривой. Для определения содержания общего белка в пробах в качестве стандартной молекулы использовали БСА, для определения количества низкомолекулярных продуктов гидролиза — тирозин.

2.2.5. Нингидриновый метод

В основе метода лежит спектрофотометрическое определение аминокислот путём измерения интенсивности образования окрашенного продукта реакции между нингидрином и α-аминокислотами (рис. 1).

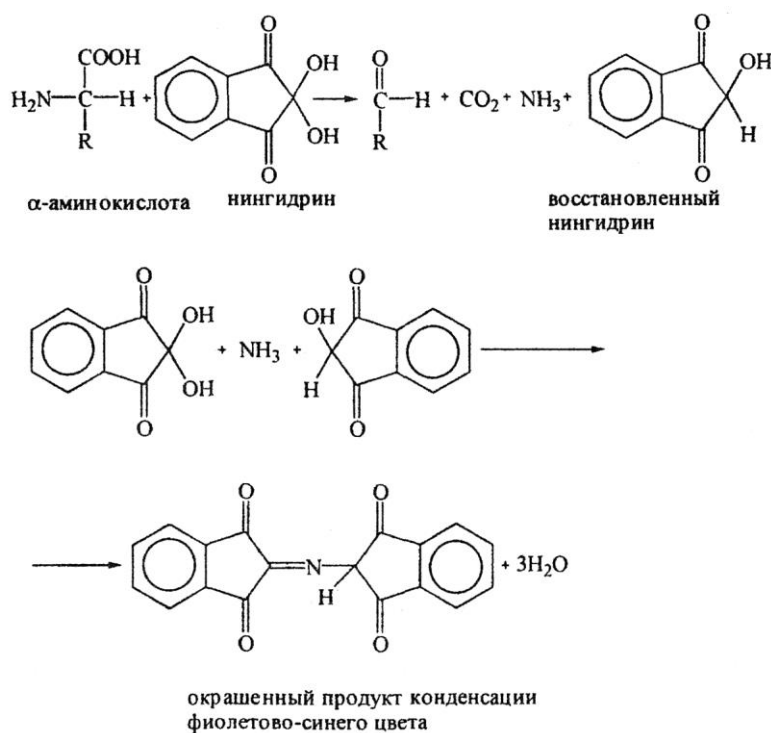


Рис. 1. Принцип нингидриновой реакции

В пробирках смешивали 50 мкл исследуемого раствора и 500 мкл 1%-го спиртового раствора нингидрина, пробы инкубировали в течение 15 мин на кипящей водяной бане, после чего измеряли оптическую плотность растворов на спектрофотометре при длине волны 560 нм (Кручинина, 2015).

2.3. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка данных проводилась в программе Microsoft Office 365 Excel. При проведении химических или ферментативных реакций пробы ставили в трёхкратной повторности и вычисляли ошибку среднего. Для определения значимости различий при групповом сравнении полученных средних результатов вычисляли t-критерий Стьюдента (порог значимости $p < 0,05$).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Размер экспериментальной выборки

Экспериментальная выборка насчитывала 32 пробы: 16 проб от здоровых пациентов (8 мужчин и 8 женщин в возрасте от 40 до 70 лет) и 16 проб от пациентов с органическими поражениями мозга (8 мужчин и 8 женщин в возрасте от 40 до 70 лет, 50% из которых составляли пациенты с болезнью Альцгеймера, половина — с нарушением мозгового кровообращения).

3.2. Калибровочные прямые

Для определения концентрации аргинина нингидриновым методом при определении активности лизинкарбоксипептидазы была построена калибровочная прямая по стандартным разведениям аргинина с концентрацией от 1000 до 2000 мкг/мл (с шагом 100 мкг/мл) (рис. 2). Полученная кривая методом наименьших квадратов была линеаризована с получением уравнения прямой, которое было использовано для вычисления концентрации в экспериментальных пробах.

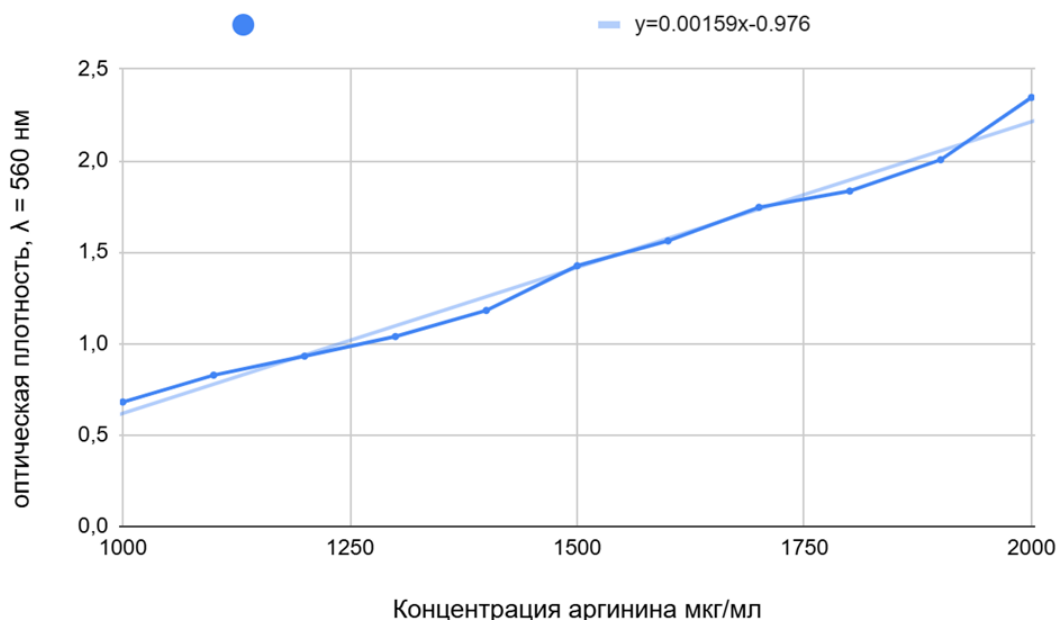


Рис. 2. Калибровочный график по аргинину

Аналогичным образом была построена калибровочная прямая по тирозину для определения активности катепсина D. Концентрация стандартных разведений тирозина составила от 10 до 100 мкг/мл (с шагом 10 мкг/мл). Данные представлены на рис. 3.

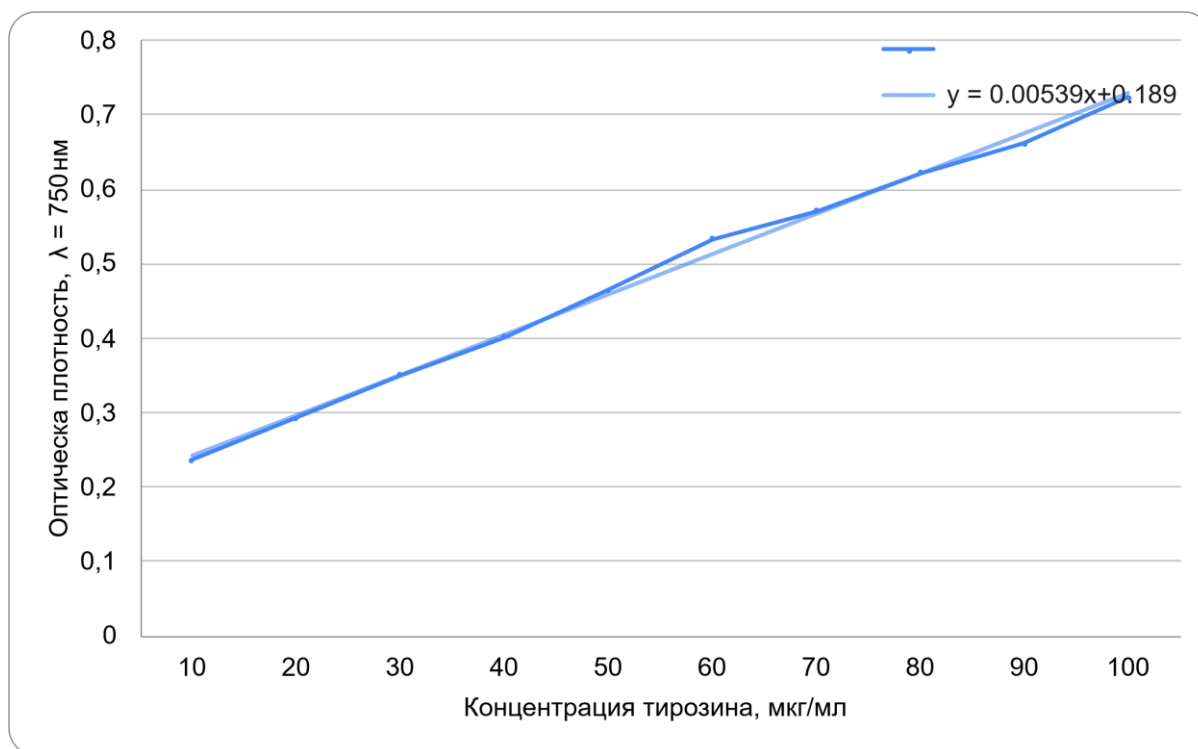


Рис. 3. Калибровочный график по тирозину

Для определения концентрации общего белка в пробах была построена калибровочная прямая по БСА. Концентрация стандартных растворов составила от 10 до 100 мкг/мл (с шагом 10 мкг/мл). Данные представлены на рис. 4.

На рис. 5 представлена калибровочная прямая по гли-арг, используемая для определения активности пептидил-дипептидазы А. Концентрация стандартных растворов составила от 0,5 до 4 мМ (с шагом 0,5 мМ).

Полученные данные были использованы для определения относительной ферментативной активности, выраженной в единице концентрации образовавшегося субстрата за единицу времени инкубации на 1 мг общего белка в пробе.

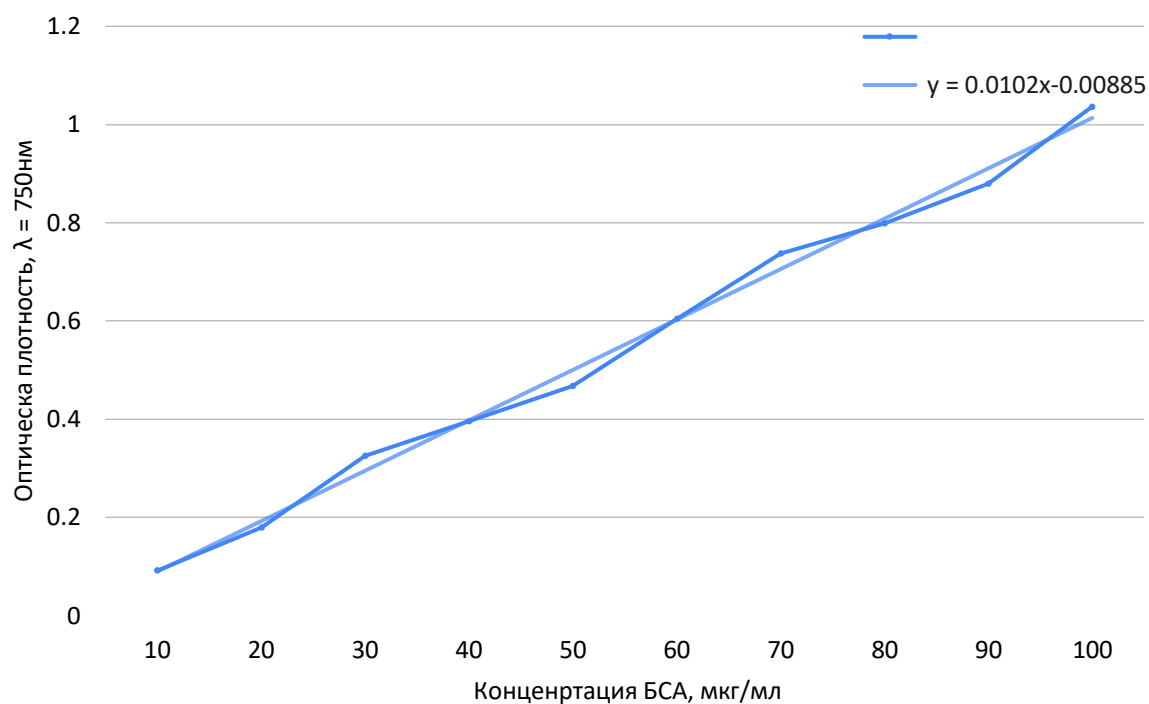


Рис. 4. Калибровочный график по бычьему сывороточному альбумину

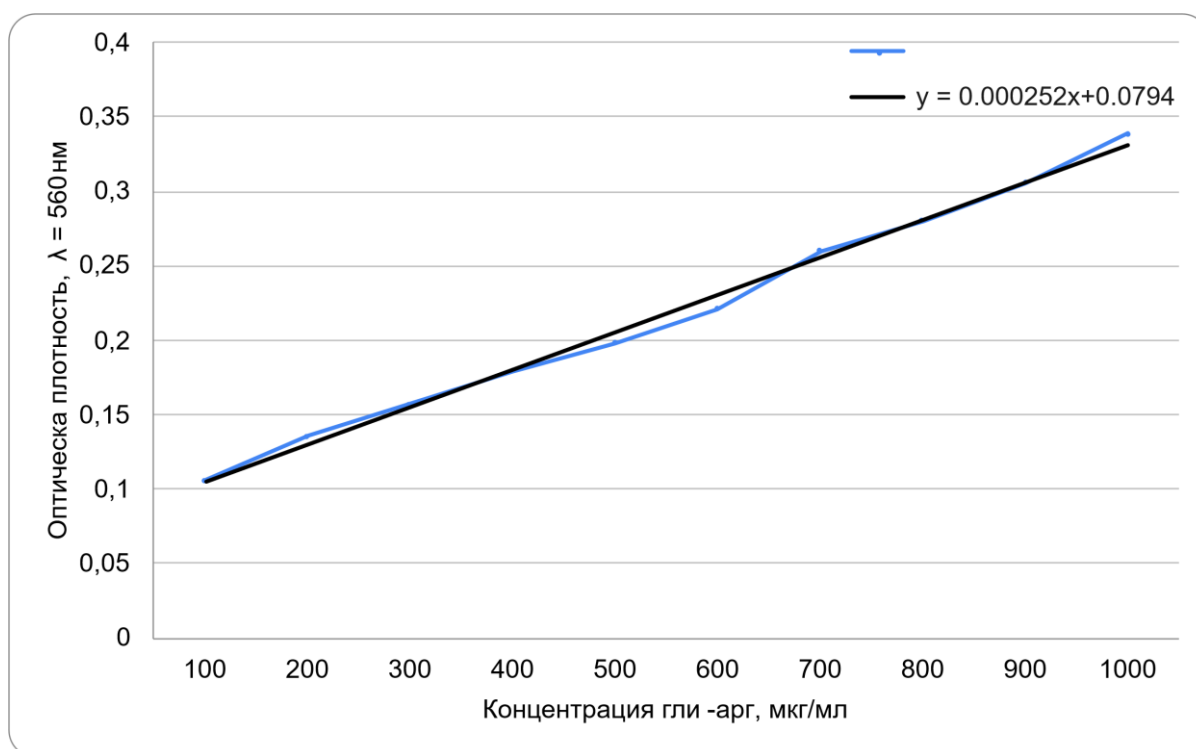


Рис. 5. Калибровочный график по гли-арг

3.3. Основные результаты по определению активности плазменных протеаз

Для сравнения полученных и статистически обработанных экспериментальных данных были построены столбчатые диаграммы, показывающие разницу в активности ферментов среди здоровых и больных органическими поражениями мозга пациентов. Данные были разделены на полученные от мужчин и женщин для определения наличия половых вариаций и исключения их влияния на конечные результаты. Несмотря на то, что органические поражения мозга — чрезвычайно неоднородная группа заболеваний, в рамках данного эксперимента пациенты с болезнью Альцгеймера и нарушением мозгового кровообращения продемонстрировали аналогичные изменения в уровне активности исследованных ферментов, поэтому их данные были объединены в одну группу.

3.3.1. Активность лизинкарбоксипептидазы

На рисунках 6 и 7 показано сравнение активности лизинкарбоксипептидазы у здоровых и больных женщин и мужчин соответственно.

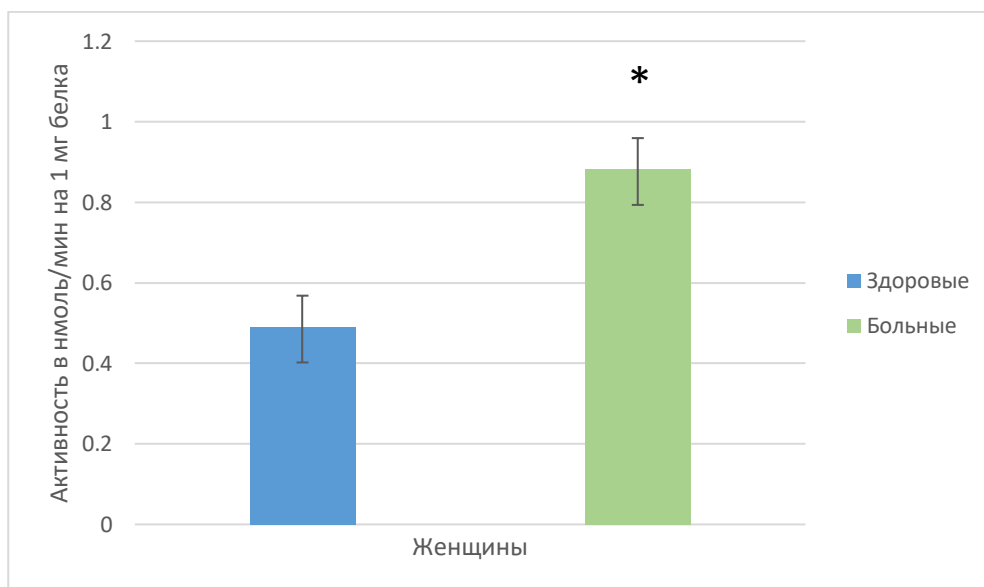


Рис. 6. Активность лизинкарбоксипептидазы у здоровых и больных женщин, * - $p < 0,05$

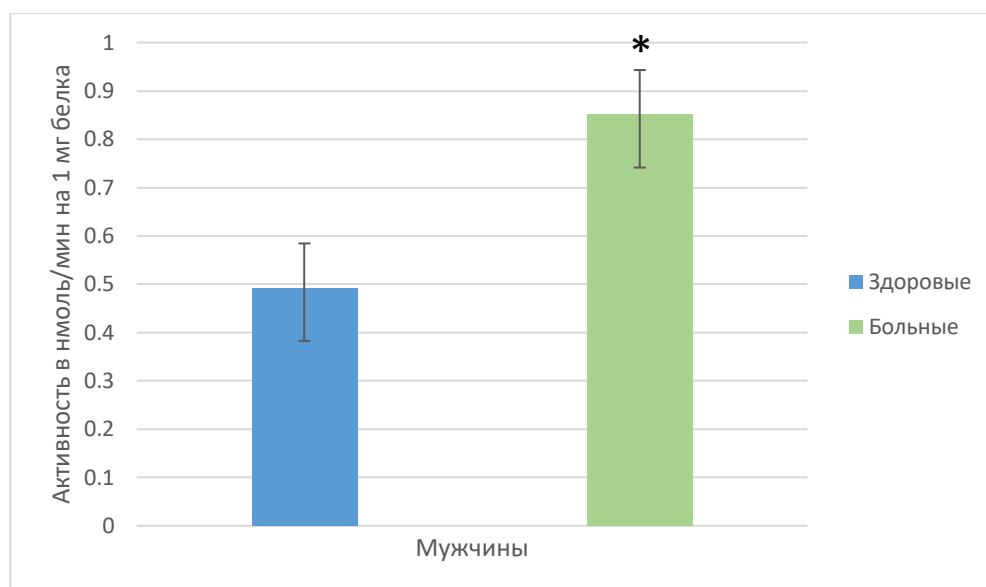


Рис. 7. Активность лизинкарбоксипептидазы у здоровых и больных мужчин, * - $p < 0,05$

Найдено, что органические поражения мозга влияют на активность плазменной формы лизинкарбоксипептидазы, повышая её. Так, по сравнению со здоровыми мужчинами, у больных активность этого фермента выше на 36%, у больных женщин по сравнению со здоровыми – выше на 39%.

Такие изменения могут быть связаны с участием лизинкарбоксипептидазы в регуляции иммунного ответа воспалительного характера. По данным литературы, данный фермент кодируется геном CPN1, наибольшая активность которого наблюдается в печени, а в нервной ткани он не экспрессируется совсем. В норме лизинкарбоксипептидаза инактивирует анафилатоксины (C3a, C5a) и кинины (брадикинин), которые являются мощными воспалительными медиаторами (Information on EC 3.4.17.3...), участвует в фибринолизе и коагуляции, включая связывание с фибриногеном и фибрином, а также проявление антифибринолитической активности (Скидгель, Эрдёс, 2007). При органических поражениях мозга, особенно при нейродегенеративных заболеваниях и острых нарушениях мозгового кровообращения, в центральной нервной системе возникают локальные очаги воспаления. При прогрессе патологии снижается барьерная функция гематоэнцефалического барьера, что приводит к появлению в кровотоке провоспалительных факторов, продуктов распада регуляторных белков и

других медиаторов системного воспаления. Например, в случае болезни Альцгеймера в крови начинают обнаруживаться различные фрагменты β -амилоидных белков.

Несмотря на то, что CPN1 не экспрессируется в тканях головного мозга, в различных структурах центральной нервной системы была обнаружена схожая ферментативная активность, по-видимому, катализируемая другими ферментами (например, карбоксипептидаза В, карбоксипептидаза Е). Например, при анализе посмертных образцов гиппокампа и коры больших полушарий пациентов с болезнью Альцгеймера было выявлено, что лизинкарбоксипептидазная активность выше на 50-80% по сравнению с образцами из тех же регионов головного мозга людей, не страдавших данной болезнью (Govindarajan et al, 2015).

Всё это указывает на то, что хоть лизинкарбоксипептидаза не оказывает прямого влияния на патогенез и проявление симптомов при различных типах органических поражений мозга, но она косвенно участвует в регуляции ответа организма на системное, и в меньшей мере местное воспаление, которое возникает при нарушении связности и целостности нервной ткани.

Таким образом, повышение активности лизинкарбоксипептидазы может служить диагностическим и прогностическим критерием при скрининге и терапии пациентов.

3.3.2. Активность катепсина D

На рисунках 8 и 9 показаны данные об активности катепсина D среди здоровых и больных женщин и мужчин соответственно.

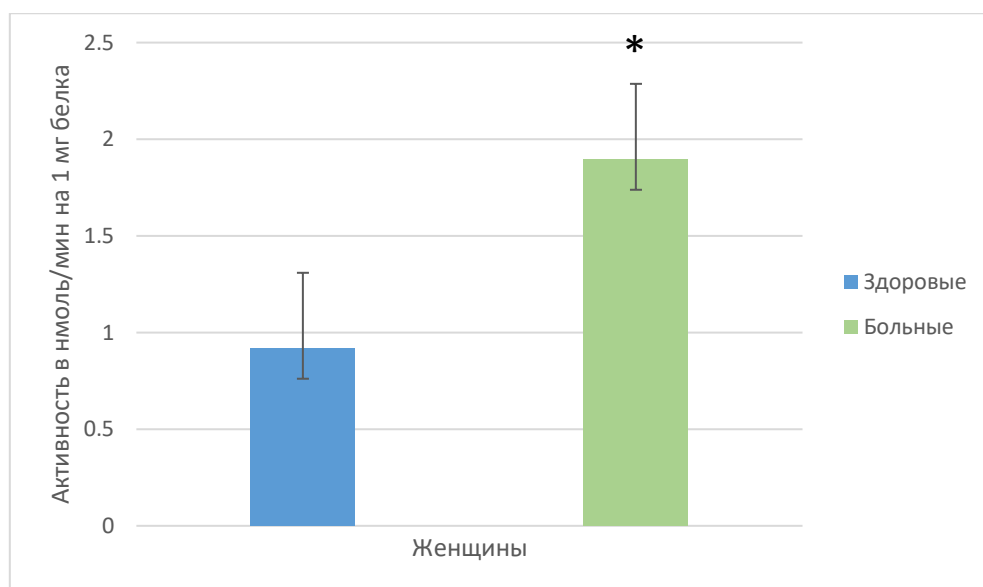


Рис. 8. Активность катепсина D у здоровых и больных женщин, * - $p < 0,05$

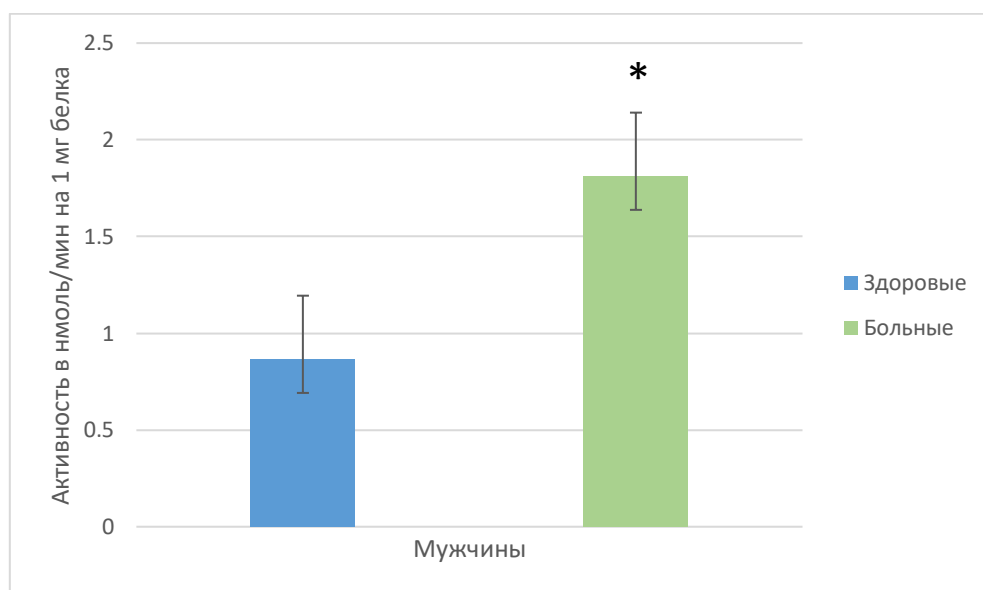


Рис. 9. Активность катепсина D у здоровых и больных мужчин, * - $p < 0,05$

Анализируя полученные данные можно заключить, что активность катепсина D у больных женщин по сравнению со здоровыми увеличивается на 98%; у больных мужчин – на 95%.

В норме катепсин D является лизосомальным ферментом, оптимум pH лежит в районе 4,0-5,0 ед., однако его ферментативная активность в некоторой степени сохраняется и при нейтральных значениях pH. Катепсин D участвует в протеолитическом расщеплении поврежденных или

патологических белков в лизосомах, участвует в активации ферментов путём ограниченного протеолиза (Corvol et al, 1995).

При нейродегенерации и травматическом разрушении нейронов и клеток глии происходит фрагментация лизосом, что ведет к попаданию катепсина D в межклеточное пространство и в кровь. При развитии очагов воспаления наблюдается местное смещение кислотно-основного равновесия в сторону повышения кислотности, что увеличивает активность катепсина D, попавшего в межклеточную среду. В связи с этим фермент начинает расщеплять всё больше и больше белков, оказавшихся доступными для такого патологического протеолиза, что увеличивает прогресс патологии. Например, на начальных стадиях болезни Альцгеймера катепсин D участвует в утилизации амилоидных белков, однако с прогрессом заболевания происходит сверхэкспрессия генов катепсина D как адаптационный механизм к увеличению концентрации амилоидов, что приводит к накоплению катепсина D, увеличению проницаемости лизосомальных мембран и повреждению нейронов, что усиливает процессы воспаления (Domenico et al, 2016).

Однако данные о влиянии нарушения мозгового кровообращения на активность катепсина D не столь однозначны. Часть исследований указывает на то, что при вялотекущих нейродегенеративных и гипоксических нарушениях центральной нервной системы активность данного фермента снижается (PubMed Central...). Возможно, причина наблюдаемого эффекта лежит в общем снижении метаболизма нервной ткани за счёт субпатологического снижения поступления кислорода. В нашем исследовании в выборке были пациенты, имеющие в анамнезе острые нарушения мозгового кровообращения. Активность катепсина D у таких пациентов наоборот была повышена. По-видимому, при острых нарушениях мозгового кровообращения за счёт массивного некроза нейронов и увеличения проницаемости гематоэнцефалического барьера в кровь

поступает большое количество катепсина D, протеолитически атакующего различные регуляторные и структурные белки организма, что вносит вклад в системное воспаление.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при острых нарушениях мозгового кровообращения активность катепсина D изменяется по тому же принципу, что при болезни Альцгеймера, т. к. не было найдено различий в характере повышения ферментативной активности среди этих двух групп больных.

3.3.3 Активность пептидил-дипептидазы A

На рисунках 10 и 11 представлено сравнение ферментативной активности пептидил-дипептидазы A среди здоровых и больных женщин и мужчин соответственно.

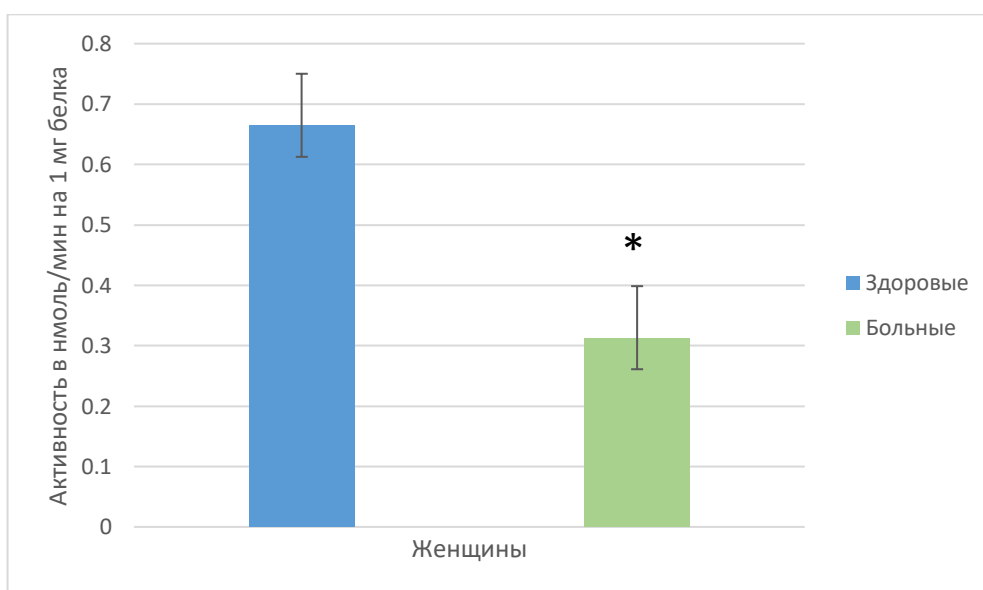


Рис. 10. Активность пептидил-дипептидазы A у здоровых и больных женщин, * - $p < 0,05$

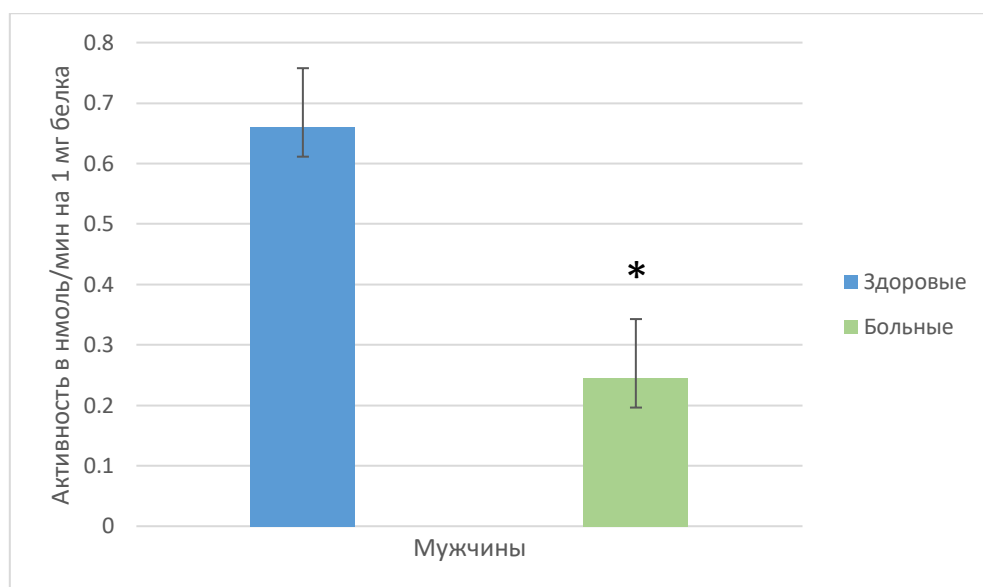


Рис. 10. Активность пептидил-дипептидазы А у здоровых и больных мужчин, * - $p < 0,05$

Анализируя полученные данные можно сказать, что в отличие от лизинкарбоксипептидазы и катепсина D, активность которых при органических поражениях мозга возрастает, активность пептидил-дипептидазы А наоборот уменьшается. Так, по сравнению со здоровыми мужчинами у пациентов с болезнью Альцгеймера и острым нарушением мозгового кровообращения активность ПДПА снижена на 42%; у пациентов-женщин активность ПДПА по сравнению со здоровыми женщинами меньше на 35%.

В норме за пределами центральной нервной системы пептидил-дипептидаза А более известна как ангиотензинпревращающий фермент, участвующий в работе ренин-ангиотензиновой системы, однако ПДПА экспрессируется не только на эндотелии сосудов, но практически во всех тканях организма, в том числе в нервной. В мозге пептидил-дипептидаза А специфически локализуется в различных клеточных компартментах и регионах. Фермент обнаруживается в церебральных кровеносных сосудах, особенно концентрируется в сосудистом сплетении, на поверхности астроцитов в перивентрикулярных областях и в некоторых популяциях нейронов, участвуя в метаболизме таких нейропептидов, как вещество Р, холецистокинин, гонадолиберин, β -неоэндофин, динарфин, нейротензин,

фезалимин, амиды лей- и мет-энкефалинов, В-цепь инсулина, гастрин, геморегуляторный пептид AcSDKP, ангиотензин 1-7. Известно также, что пептидил-дипептидаза А участвует в метаболизме амилоидных белков, деградируя A β 40 и A β 42 (Иванов, Петров, 2021).

Полученные результаты по изучению активности пептидил-дипептидазы А у больных органическими поражениями мозга не только согласуются с данными научной литературы, но дополняют их. Известно, что сверхэкспрессия гена ACE, кодирующего данный фермент, приводит к усилению воспалительного ответа организма на стрессовые факторы, в том числе на нейродегенерацию (Короньо-Хамауи и др, 2014). Найдены также данные о том, что у пациентов с болезнью Альцгеймера, имеющих мутации, приводящие к снижению активности пептидил-дипептидазы А, симптомы заболевания были выражены сильнее. По-видимому, снижение активности ПДПА связано как с нарушением механизма синтеза этого фермента, так и с нейродегенеративными процессами в центральной нервной системе. Из-за неспособности синтезировать адекватное количество пептидил-дипептидазы А нервная ткань начинает накапливать амилоидные белки, формирующие отложения, которые и определяют основной патофизиологический механизм формирования болезни Альцгеймера. В то же время фермент образуется в нейронах и перемещается по аксонам для обеспечения процесса созревания нейропептидов. При поражениях мозговой ткани происходит массовая гибель нейронов и снижение синтетической активности в клетках, что приводит к снижению активности секретируемой формы ПДПА. Дополнительно, при развитии системного воспаления, особенно в случае острого нарушения мозгового кровообращения, наблюдается повышение уровня свободных радикалов, ингибирующих данный фермент (Нассан и др., 2023).

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о комплексном патогенезе органических поражений мозга и о сложных функциональных связях между активностью протеолитических ферментов и

физиологических изменениях, наблюдаемых при болезни Альцгеймера и нарушении мозгового кровообращения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Протеолитические ферменты играют важную роль в организме, регулируя многие физиологические процессы. В научной литературе существует ограниченное количество данных о влиянии органических поражений мозга на активность протеаз.

Полученные экспериментальные данные в совокупности с существующими литературными источниками позволяют сделать следующие выводы:

1. Согласно изученной литературе, протеолитические ферменты играют значительную роль в регуляции многих процессов организма. При органических поражениях мозга их активность изменяется, что может как усугублять состояние, так и помогать в восстановлении и защите клеток.

2. По результатам эксперимента, было выявлено, что активность лизинкарбоксипептидазы у мужчин с органическими поражениями мозга выше на 36%, в отличие от здоровых, у женщин с данным заболеванием активность фермента выше на 39%; активность катепсина D выше у больных мужчин, чем у здоровых, на 95%; у женщин; активность пептидил-дипептидазы A ниже у больных мужчин, чем у здоровых, на 42%; у женщин с органическими поражениями мозга активность фермента ниже на 35%.

3. На основании проведенного исследования можно заключить, что выявленные изменения активности протеолитических ферментов в плазме крови пациентов с органическими поражениями головного мозга обусловлены как особенностями их биологических функций, так и нарушениями процессов синтеза и регуляции данных ферментов в организме.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Авлиякулыева А. М., Киндякова Е. К., Кузьмина С. В., Горина Я. В., Лопатина О. Л. Роль нейропептидов (окситоцин, вазопрессин, нейропептид S) в развитии когнитивных нарушений при болезни Альцгеймера // Бюллетень сибирской медицины – 2024. – С. 107-108.
2. Геренг Е.А., Мильто И.В., Иванова В.В., Суходоло И.В. Функциональная анатомия центральной нервной системы человека // уч. пособие – Томск: Изд-во СибГМУ, 2022. – С. 49-109.
3. Гонсалес Н., Муди Т.В., Игараси Х., Ито Т., Дженсен Р.Т. Пептиды, связанные с бомбезином, и их рецепторы: последние достижения в изучении их роли в физиологии и болезненных состояниях. – 2008. – С. 58–64.
4. Димент С., Мартин К.Дж., Шталь П.Д. Расщепление гормона паращитовидной железы в эндосомах макрофагов иллюстрирует новый путь внутриклеточной обработки белков // Журнал биологической химии – 1989.
5. Златник Е. Ю., Ситковская А. О., Непомнящая Е. М., Джандигова Ф. Р., Ващенко Л. Н. Достижения и перспективы клеточных технологий на основе активированных лимфоцитов в лечении злокачественных опухолей. – 2018. - С. 4-7.
6. Иванов А.А., Петров Б.В. Роль ангиотензинпревращающего фермента в патогенезе нейродегенеративных заболеваний // Наука и образование. — 2021. — С. 45–52.
7. Иванов А.А., Петрова В.М. Нейропептиды в регуляции активности головного мозга в норме и при нейродегенерации.— 2020. - С. 34-48.
8. Короньо-Хамауи М., Шах К., Короньо Й., Бернштейн Э., Джани Дж. Ф., Джанджулия Т., Блэк К. Л., Ши П. Д., Гонсалес-Вильялобос Р. А., Фукс С., Шен К. З., Бернштейн К. Э. Сверхэкспрессия ACE в миеломоноцитарных клетках: влияние на мышиную модель болезни Альцгеймера. – 2014.
9. Крепелин Э. Диагностическое и статистическое руководство по психическим расстройствам. – 2000. – С. 40-50.

10. Кручинина А. Д. Активность пептидил-дипептидазы а и лизинкарбоксипептидазы в сыворотке крови крыс при однократном введении ребоксетина // ИВУЗ ПР Естественные науки. – 2015. – №2 (10). – С. 94-100.
11. Левильер Н., Перон М., Аррио Б., Падлс Дж. О механизме действия протеолитических ингибиторов // Архивы биохимии и биофизики. – 1970. – С. 474–483.
12. Лелевич В.В. Нейрохимия // уч. пособие – Гродно: ГрГМУ, - 2021. – С. 63-73.
13. Лихтерман Л. Б., Кравчук А. Д., Охлопков В. А. Травматические повреждения головного мозга: классификация, клиника, нейровизуализация //Клинический разбор в общей медицине. – 2023. – Т. 4. – №. 10. – С. 34-50.
14. Маклахлан Р., Кехо П.Г., Майнерс Дж.С. Нарушение регуляции ППДА при нормальном старении и на ранних стадиях болезни Альцгеймера – 2022. – С. 5-10.
15. Мэйнс Р.Э., Эйппер Б.А. Нейропептиды // Основы нейрохимии. - 6-е изд, Липпинкотт-Рейвен. – 1999. – С. 20-30.
19. Нассан М., Даглас И., Пирас И.С., Рогальски Э., Реус Л.М., Пийненбург Й., Кадди Л.К., Сакена Р., Месулам М.М., Хьюэнтелман М. Оценка связи между генетически опосредованным ингибированием АПФ и деменцией. Альцгеймер и деменция. – 2023. – С. 6-12.
20. О. И. Дорогина. Нейрофизиология // уч. пособие — Екатеринбург : Изд-во Урал. ун-та,— 2019. – С. 91-96.
21. Официальный сайт Всемирной организации здравоохранения. URL: https://gateway.euro.who.int/ru/indicators/hfa_116-1350-sdr-cerebrovascular-diseases-0-64-per-100-000/#id=19039.
22. Прусаков В. Ф., Морозова Е. А., Марулина В. И., Уткузова М. А., Белоусова М. В., Зайкова Ф. М. Перинатальная патология мозга и ее последствия – 2010. – С. 46-50.

25. Рыжкова Е. И., Почитаева И. П., Фесенко Э. В., Ищенко К. А. Пептидные комплексы как регуляторы функционирования поджелудочной железы и их роль в повышении биологической ресурсности живых систем - 2022. – С. 355-358.
26. Сергалиева М.У., Цибизова А.А., Кринцова Т.А., Сомотруева М.А. Опиоидные пептиды: физиологическая роль, молекулярные механизмы и фармакологическая активность // Российский журнал боли. – 2023. – С. 43-49.
27. Скидгель Р.А., Эрдёс Э.Г. Структура и функция карбоксипептидазы N в плазме человека, инактивирующей анафилатоксин. - 2007.
28. Соловьев В.Б., Генгин М.Т. Лабораторный практикум "Физико-химические методы исследований": учебно-методическое пособие для студентов 3 курса специальности "Биохимия". - Пенза: Издательство Пензенского государственного педагогического университета им. В. Г. Белинского, 2012. – с.72.
29. Сычёва М.А., Сергеева И.Г., Тулупов А.А. Органическое поражение мозга // уч. пособие. - Новосиб. гос. ун-т. – Новосибирск : РИЦ НГУ, – 2015. – С. 3-4.
30. Тепляшина Е. А., Оловянникова Р. Я., Харитонов Е. В., Лопатина О. Л., Кутяков В. А., Пащенко С. И., Пожиленкова Е. А., Салмина А. Б. Нейропептиды в регуляции активности головного мозга в норме и при нейродегенерации // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии - 2020. – С. 3-10.
31. Третьякевич З. Н., Левчин А. М., Анцупова В. В., Федота А. М. Калликреин-кининовая система как адаптационно-защитное звено организма // Современная медицина: актуальные вопросы. - 2013. – С. 7-13.
32. Хёкфельт Т., Бартфай Т., Блум Ф. Нейропептиды: возможности для разработки лекарств. – 2003 – С. 23–32.

33. Хоссейн М.И., Маркус Дж.М., Ли Дж.Х., Гарсия П.Л., Сингх В., Шака Дж.Дж., Чжан Дж., Гропен Т.И., Фалани К.Н., Андраби С.А. Восстановление CTSD (катепсина D) и функции лизосом при инсульте оказывает нейропротекторное действие. – 2021.
34. Чайлдс Г.В., Вестлунд К.Н., Тиболт Р.Э., Ллойд Дж.М. Гипоталамические регуляторные пептиды и их рецепторы: цитохимические исследования их роли в регуляции на уровне аденогипофиза // Журнал электронной микроскопии. – 1991. - С. 21–41.
35. Corvol P., Williams T., Sourbrier F. Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases. — 1995. — P. 283–305.
36. Domenico Di, Tramutola F., Perluigi M. Cathepsin D as a therapeutic target in Alzheimer's disease // Expert Opinion on Therapeutic Targets – 2016.
37. Govindarajan A., Rao P., Burkhardt S. Epigenetic Alterations in Alzheimer's Disease. – 2015.
38. Holmes A.; Heilig M.; Rupniak J. Nadia M.; Steckler T.; Griebel G. Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders // Trends in Pharmacological Sciences. – 2003. - P. 580–588.
39. Information on EC 3.4.17.3 – lysine carboxypeptidase, URL: <https://www.brenda-enzymes.org/enzyme.php?ecno=3.4.17.3>.
40. King S.J., Oparil S., Berecek K.H. Role of peptidyl-dipeptidase A (angiotensin-converting enzyme) in central blood pressure regulation // Hypertension. — 1991. — P. 593–599.
41. Kirstin W., Stacey L., Rick A. Carboxypeptidase N: a pleiotropic regulator of inflammation, Molecular Immunology. – 2004.
42. Lynn E. Pritchard, White A. Neuropeptide Processing and Its Impact on Melanocortin Pathways. Endocrinology – 2007.
43. Randal A. S., Alice R. J., Ervin G. E. Hydrolysis of opioid hexapeptides by carboxypeptidase N: Presence of carboxypeptidase in cell membranes // Biochemical Pharmacology. – 1984 – P. 11-18.

44. Restoration of CTSD (cathepsin D) and lysosomal function in stroke is neuroprotective - PMC - PubMed Central, URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32450052/>.

45. Savaskan E., Hock C, Olivieri G et al. Cortical alterations of angiotensin converting enzyme, angiotensin II and AT1 receptor in Alzheimer's dementia // *Neuropharmacology*. — 2001. — Vol. 40, № 5. — P. 737–745.

46. Smith A.B., Johnson C.D. Neurobiological mechanisms of memory formation // *Neuropsychologia*. - 2000. - Vol. 38(3). – P. 345-356.

47. Smith J.A., Johnson B.C., Lee M.K. Cognitive Neural Mechanisms of Decision Making Processes // *Frontiers in Human Neuroscience*. — 2020. — Vol. 14. — P. 1-15.

48. Van den Berghe G. Neuroendocrine pathobiology of chronic critical illness // *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. — 2008. — P. 217–232.

49. Yamamoto K., Saito H. A role of the brain-angiotensin system in the central regulation of blood pressure // *Progress in Neurobiology*. – 1982. – P. 307–318.