

Кварталы № Д118 ч 18/4 90с

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО НАРОДНОМУ ОБРАЗОВАНИЮ

1385
13

ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ
УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ имени ПАТРИСА ЛУМУМБЫ

На правах рукописи

ЕЛИСЕЕВА Юлия Евгеньевна

УДК 612.46.015.1 : 577.152.34

СВОЙСТВА И РЕГУЛЯТОРНЫЕ ФУНКЦИИ
КАРБОКСИКАТЕПСИНА
(АНГИОТЕНЗИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА)

(03.00.04 — биохимия)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва — 1990

Работа выполнена в Институте биологической и медицинской химии АМН СССР.

Официальные оппоненты:

академик АМН СССР, доктор биологических наук,
профессор **А. П. Ашмарин**,
доктор биологических наук, профессор **Г. А. Яровая**,
доктор биологических наук **Н. Н. Чернов**.

Ведущая организация — I Московский медицинский институт им. И. М. Сеченова.

Защита диссертации состоится « » 1990 г.
в часов на заседании специализированного совета
Д 053.22.02 при Университете дружбы народов им. Патриса Лумумбы по адресу: 117198 ГСП, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8, медицинский факультет.

Автореферат разослан « » 1990 г.

Ученый секретарь
специализированного совета

В. Э. ТОРБЕК

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В связи с широкой распространенностью сердечно-сосудистых заболеваний выяснение молекулярных механизмов регуляции общего и регионарного кровообращения приобретает первостепенное значение. Регуляция артериального давления (АД), как и многие другие процессы в организме, осуществляется при участии биологически активных веществ противоположно направленного действия. Изучение прессорных и депрессорных систем организма, выяснение их взаимоотношений и регуляции их деятельности важно как для понимания сути процесса, так и для целенаправленного воздействия на него. Такие исследования закладывают основы для разработки эффективных мер терапии и профилактики.

Регуляция АД, поддержание кровообращения, включая микроциркуляцию, на определенном уровне в постепенно меняющихся условиях внешней среды и в зависимости от состояния организма представляет собой комплексный процесс, обеспечивающий необходимый уровень кровоснабжения тканей. По современным представлениям, основным биохимическим механизмом, посредством которого осуществляется постоянная регуляция АД и микроциркуляции, является ренин-ангиотензиновая система (РАС), контролирующая сосудистый тонус и водно-солевой баланс — оба фактора, определяющие уровень АД. Она функционирует в тесной взаимосвязи с центральной и симпатической нервной системой (Catt et al., 1984), влияние которых на АД, как и целого ряда эндогенных веществ, реализуется в большой мере при участии РАС (Imig et al. 1980). Антагонистом РАС по действию на АД является калликреин-кининовая система (ККС), уравновешивающая в какой-то степени прессорное действие РАС. Обе эти системы включают каскады реакций ограниченного протеолиза, приводящих к образованию vasoактивных пептидов ангиотензина II (А II) и брадикинина (Бк), отличающихся противоположным действием на гемодинамику и водно-солевой обмен. Ферменты, участвующие в образовании и инактивации этих пептидов, являющиеся регуляторами их концентрации в крови и тканях, могут определять в конечном итоге их эффект в организме.

Конечный этап образования активного прессорного пептида А II катализирует ангиотензин-превращающий фермент (карбоксипептидаза, кининаза II, дипептидил-карбоксипептидаза А, КФ 3.4.15.1). Этот фермент привлекает внимание исследователей во всем мире, и интерес к нему продолжает расти, в особенности со стороны фармакологов и клиницистов. Это связано с его ролью в регуляции кровообращения и

с тем, что он является центральным звеном, воздействием на которое можно целенаправленно влиять на уровень АД и кровоснабжение органов. Торможение его активности введением специфических ингибиторов (каптоприл, эналаприл, рамиприл), отличающихся высокой избирательностью, приводит к снижению повышенного АД почти при всех формах гипертензивных состояний, в том числе и при гипертониях, не поддающихся лечению традиционными средствами (Davies et al., 1984; Neel et al., 1980). Ингибиторы оказывают хороший лечебный эффект, обусловленный улучшением кровоснабжения, при сердечно-сосудистой недостаточности (Romaniewicz et al., 1983), инфаркте миокарда (Brtl et al., 1982), шоках различного происхождения (Freeman et al., 1984).

Цель и основные задачи исследования. Целью работы являлось изучение свойств и биологической функции протеолитического фермента, обнаруженного нами в коре почек бика и названного карбоксипептином (Кк).

В основе задачи работы входило: 1) Разработка метода выделения и получение гомогенного препарата Кк, 2) Изучение физико-химических свойств и специфичности действия Кк на пептиды, а также торможения его активности различными ингибиторами, 3) Выяснение биологической роли Кк. Разработка метода определения его активности в сыворотке крови и выяснение ее уровня у людей в норме. Исследование изменений активности Кк при некоторых патологических состояниях у людей и животных, 4) Поиски эндогенных модуляторов фермента, 5) Поиск синтетических высокоактивных ингибиторов Кк, оказывающих антигипертензивное действие.

Научная новизна. Обнаружен протеолитический фермент Кк, отличающийся по специфичности действия от известных протеиназ тканей.

Впервые был разработан метод выделения Кк и впервые получен высокоочищенный фермент.

Исследование особенностей действия Кк на синтетические пептиды позволило сформулировать основные требования фермента к структуре пептидов, выяснить влияние различных группировок на скорость гидролиза пептида ферментом, показать способность фермента расщеплять пептиды только в направлении.

Впервые показано, что превращение А I в А II и расщепление Гк осуществляются одним ферментом. На основании проведенных исследований и обобщения полученных результатов сформулировано принципиальное утверждение относительно о функции Кк в организме. Выдвинута концепция

ция его ключевой роли в регуляции концентрации vasoактивных пептидов-антагонистов А II и Бк в крови и тканях.

Обнаружено присутствие Кк в синовиальной жидкости, полученной из воспаленных суставов больных артритами различной этиологии.

Обнаружены природные ингибиторы Кк в сыворотке и лейкоцитах (нейтрофилах и мононуклеарах) человека и быка, в синовиальной жидкости больных артритами, в легких и почках быка, а также в яде змеи бфы и кобры.

Обнаружен эндогенный активатор Кк в нейтрофилах и в крови человека.

Показана в экспериментах на собаках возможность применения ингибиторов Кк с целью повышения выживаемости и снижения осложнений в постреанимационном периоде.

Практическая значимость. Важное теоретическое и практическое значение имеют исследования, которые привели к обнаружению ключевой роли Кк. Они создали основу для понимания взаимосвязи ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем — двух физиологических систем, участвующих в регуляции АД и считавшихся до этого не связанными между собой. Это привело к новому уровню понимания механизма регуляции кровообращения в организме. На основе ингибиторов Кк были созданы высокоэффективные антигипертензивные препараты, оказывающие положительный терапевтический эффект при различных формах гипертонии, при сердечно-сосудистой недостаточности и других нарушениях кровообращения.

Исследования, посвященные поиску новых синтетических ингибиторов Кк, активных при пероральном применении, позволили предложить новое соединение, отличающееся высокой антигипертензивной активностью в опытах на крысах с различными формами гипертонии.

Применение специфичного ингибитора Кк тепротида на ранних стадиях реанимации, вызывая улучшение кровоснабжения органов, оказывало защитное терапевтическое действие, выражавшееся в снижении осложнений со стороны ЦНС и повышении выживаемости. Полученные результаты представляют существенный интерес, т.е. полноценное восстановление функций ЦНС является основной целью при оказании организма после терминального состояния.

Обнаружение и изучение природных ингибиторов и активаторов Кк, находящихся в крови и лейкоцитах человека, в перспективе может привести к выяснению механизма регуляции Кк в организме. Кроме того, это может послужить основой для создания новых терапевтических

средств, а также может оказать помощь в ранней диагностике ряда заболеваний, включая гипертонию, различные воспалительные процессы, заболевания, сопровождающиеся нарушениями системы комплемента.

Обнаружение ингибиторов Кк в лейкоцитах имеет теоретическое и практическое значение для понимания участия Кк в воспалении. Эти данные позволили предложить гипотезу механизма влияния лейкоцитов на проницаемость сосудов при воспалении.

Предложенный нами метод определения активности Кк в сыворотке был передан в ряд клиник страны (Ленинград, Харьков, Ашхабад, Хабаровск, Рига).

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на I, II, III и IV Всесоюзных биохимических съездах (Ленинград, 1964; Ташкент, 1969; Рига, 1974; Киев, 1985), на сессиях Отделения медико-биологических наук АМН СССР (Москва, 1976; Ереван, 1982; Москва, 1983), Советско-итальянском биохимическом симпозиуме (Москва, 1977), 17-м съезде терапевтов (Москва, 1974), III Всероссийском съезде кардиологов (Свердловск, 1985), Симпозиуме по биологически активным пептидам и белкам (Баку, 1980), 4 Всесоюзном симпозиуме по медицинской энзимологии (Алма-Ата, 1983), VI Международном биохимическом конгрессе (Нью-Йорк, 1964), IV Конгрессе ревматологов латиноамериканских стран (Льеж, Бельгия, 1980).

Положения, выносимые на защиту.

1. Обнаружение нового протеолитического фермента, карбоксикаптепсина, отщепляющего дипептиды с карбоксильного конца различных по строению пептидов; его физико-химические и энзиматические свойства.

2. Идентификация карбоксикаптепсина с двумя разными ферментами, описанными как ангиотензин-превращающий фермент и кининаза II, и доказательство его ключевой роли в функционировании ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем, контролируемых кровяное давление.

3. Результаты исследований активности Кк в сыворотке больных рено-васкулярной гипертонией и гипертонической болезнью и у собак в экстремальных состояниях, свидетельствующие в пользу его участия в защитных компенсаторных реакциях организма, направленных на восстановление нормального кровообращения.

4. Обнаружение эндогенных ингибиторов карбоксикаптепсина в крови, лейкоцитах и синовиальной жидкости человека и активатора(ов) в крови и нейтрофилах человека; их физиологическое значение.

5. Возможность терапевтического применения синтетических ингибиторов карбоксикаптепсина при ренинарии.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методической части, трех глав собственных исследований, обсуждения результатов, заключения и выводов. Диссертация изложена на страницах машинописного текста, содержит 48 рисунков и 36 таблиц. Список литературы включает наименований.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами был обнаружен в коре почек быка протеолитический фермент, отличавшийся от известных протеиназ тканей, и назван карбоксипептином (Кк) (Елисеева, Орехович, 1963). В "Номенклатуру ферментов" (1972 г.) он был внесен под названием пептидил-дипептидаза (КФ 3.4.15.1), которое позднее было заменено на дипептидил-карбоксипептидаза А. (В литературе в последнее время наиболее широко применяется название "ангиотензин-превращающий фермент").

Проведенные нами исследования были первыми в области изучения его физико-химических и энзиматических свойств и выяснения физиологической роли. Они нашли подтверждение и получили дальнейшее развитие в работах многих исследователей (Ершов, 1979, 1986; Сашкин, Сидатти, 1980). Изучение свойств карбоксипептина.

Получение высокоочищенных препаратов Кк из коры почек и легких быка. Был разработан метод очистки Кк, включавший следующие стадии (табл. I):

1) Экстракция гомогената ткани 0,01 М фосфатным буфером pH 7,65, содержащим 0,25 М сахарозу.

2) Инкубация с трипсином в течение часа при 4°C.

3) Фракционирование на КМ-сефадексе С-25 в 0,005 М фосфатном буфере pH 6,5. В этих условиях Кк не связывается с ионообменником, но удается освободиться от ряда белков, которые долго сопутствуют ему при других вариантах метода. И, кроме того, на этой стадии отделяются ингибиторы Кк.

4) Фракционирование на ДЭАЭ-сефадексе А-50 проводилось в два этапа. На первом этапе (0,075 М фосфатный буфер pH 7,65) удалялись балластные белки, которые прочно связываются с ионообменником; Кк в этих условиях с ним не связывается. Это дает возможность при фракционировании на ДЭАЭ-целлюлозе существенно увеличить ее емкость по отношению к Кк.

На втором этапе снижением концентрации буфера до 0,025 М создавали условия для связывания Кк. После перенесения сефадекса в колонку Кк элюировали 0,075 М фосфатным буфером, содержащим 0,1 М NaCl.

5) Фракционирование на колонке с ДЭАЭ-целлюлозой в 0,03 М фосфатном буфере pH 7,65 с 0,01 М NaCl. Адсорбированный на ионообменнике K₂ элюировали, создавая линейный градиент концентрации NaCl 0,01 - 0,11 М в том же буфере. Фермент десорбировался при концентрации NaCl 0,03 - 0,06 М.

6) Фракционирование на гидроксилпатите в 0,015 М фосфатном буфере pH 6,8. Фермент в этих условиях остается в растворе.

7) Гель-фильтрация на сефадексе Г-200 в 0,025 М медуллоном буфере pH 7,4, содержащем 0,2 М NaCl.

Таблица I

Очистка карбоксикапсина из коры почек быка

| Фракция | Общий белок, мг | Общая активн. ед. | Уд. акт., ед/мг белка | Выход % | Степень очистки |
|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------------|---------|-----------------|
| Экстракт | 39300 | 825 | 0,021 | 100 | I |
| " + трипсин | 21050 | 1074 | 0,051 | 130 | 2,4 |
| КМ-сефадекс | 19900 | 1258 | 0,063 | 152 | 3,0 |
| ДЭАЭ-сефадекс | 1870 | 925 | 0,494 | 112 | 23,8 |
| ДЭАЭ-целл. (град) | 201 | 462 | 2,300 | 56 | 110,0 |
| Гидроксилпатит | 37,7 | 388 | 10,300 | 47 | 490,0 |
| Сефадекс Г-200 | 3,6 | 109 | 30,000 | 13 | 1429,0 |

С помощью этого метода были получены гомогенные, по данным диск-электрофореза в полиакриламидном геле, препараты K₂ из коры почек и из легких быка. Обнаруживаемая в срезах геля активность K₂ соответствовала полосе белка. В результате очистки активность K₂ по сравнению с экстрактом увеличилась в 1400-2300 раз в зависимости от уровня активности в экстракте.

Физико-химические свойства. По исследованным свойствам (табл. 2), кривая активации K₂ ионами хлора и торможения его ЭЦТА в зависимости от концентрации этих веществ, а также по степени торможения его активности пептидными ингибиторами и идами эмей (эфи и кобри) ферменты из почек и легких не отличались друг от друга.

Свойства карбоксикапсина почек и легких Таблица 2

| | |
|------------------------|--|
| Оптимальный диапазон | pH 7,2 - 7,4 |
| Молекулярная масса | 180 кД |
| Изoeлектрическая точка | pH 4,5 |
| Устойчивость | pH 6 - 8 |
| Активаторы | Ионы Cl^{-} , En^{++} , Co^{++} , K_2^{++} |

Активация ионами хлора является характерным свойством Кк, отличающим его от многих протеаз. В среде, не содержащей ионов хлора, наблюдался незначительный (1-2% от максимальной скорости) гидролиз ϵ -Gln-His-Leu. С увеличением концентрации NaCl активность Кк увеличивалась и достигала максимальной величины при 0,2 М.

Специфичность. Исследование субстратной специфичности Кк, проведенное на более 80 пептидах различного строения, позволило выделить ряд особенностей, представленных на следующей схеме:

| R_1 | R'_1 | R_2 | R'_2 |
|---------------------------------|--------|----------------------|------------------------|
| - R ₃ | ↓ | R ₂ | - R ₁ -COOH |
| - R ₃ | - | R ₂ | - R ₁ -CO-X |
| - R ₃ | ↓ | R ₂ | - R ₁ -COOH |
| - R ₃ | ↓ | R ₂ | - R ₁ -CO-X |
| - R ₃ | ↓ | R ₂ -COOH | - R ₁ -COOH |
| H ₂ N-R ₃ | - | R ₂ | - R ₁ -COOH |
| - R ₃ | - | Pro | - R ₁ -COOH |
| - Pro | ↓ | R ₂ | - R ₁ -COOH |

Кк отщепляет дипептиды с карбоксильного конца пептидной цепи субстрата, гидролизует последовательно каждую вторую пептидную связь. Фермент отличается широкой специфичностью действия, гидролизует пептиды различного строения, если они имеют свободную С-концевую карбоксильную группу. Амиды и эфиры субстратов Кк не расщепляются. Кк не гидролизует пептиды, содержащие остаток пролина в положении R'_1 . Эта особенность действия

Кк представляет особый интерес, т.к. она имеет существенное значение при гидролизе физиологических субстратов. Препятствием для гидролиза служит наличие дополнительной отрицательно заряженной группы в боковой цепи С-концевого остатка. Гидролизу пептида, но не связыванию его с ферментом мешает и близость к расщепляемой связи свободной N-концевой аминогруппы. Трипептиды с незамещенной α-аминогруппой не гидролизуются. Но тетрапептиды с блокированной и свободной аминогруппой расщепляются с одинаковой скоростью (табл.3).

Кк отличается строгой стереоспецифичностью по отношению к остаткам аминокислот, образующим расщепляемую пептидную связь. Пептиды, содержащие D-изомеры аминокислот, не гидролизуются. Пептиды с D-изомером в положении R_1 связываются с ферментом в отличие от пептидов с D-изомером в положении R'_1 .

Исследование зависимости скорости гидролиза от строения и-концевой блокирующей группировки, проведенное нами на трипептидах (синтезированы Полинским В.З.), отличающихся строением радикала уретановой группировки (табл.3), выявило некоторые закономерности, свидетельствующие о влиянии степени гидрофобности радикала на расщепление пептидов. Пептиды с алифальным радикалом поразительного строения расщеплялись медленнее, чем пептиды, имеющие бензиль-

ний остаток, но быстрее пептидов с разветвленными группировками. Степень снижения гидролиза зависела от длины углеродной цепи: меньшей она была у соединений с пропил- и бутилоксикарбонильными (C_3) группами. Вероятно, это объясняется тем, что расстояние в $(\text{CH}_2)_3$ примерно соответствует протяженности одного субстрат-связывающего участка на молекуле фермента. При разветвленной цепи алкильного остатка, включающего 3-4 углеродных атома, скорость гидролиза пептида снижалась с увеличением степени разветвленности и с приближением разветвления к расщепляемой связи. Замена разветвленной группы на циклогексил, отличающийся большей компактностью и большей гидрофобностью, приводила к значительному увеличению гидролиземости субстрата. Характеризуялся наибольшей разветвленностью t - C_6 группа мешала связыванию пептида с ферментом. Он почти не расщеплялся Кк и не тормозил гидролиз Z -Phe-His-Leu. Обнаруженные особенности взаимодействия пептидов с ферментом, по-видимому, отражают специфику строения активного центра Кк. Разветвление алкильного радикала не влияло на гидролиз пептидов α -химотрипсином, который расщепил ту же связь в t - C_6 -Phe-His-Leu и Z -Phe-His-Leu с одинаковой скоростью.

Таблица 3

Относительная скорость гидролиза пептидов типа
 $\text{ROCO-X-Phe-His-Leu}$ ОН карбоксикатапепсином

| R | X | V_2/V_1^X | R | X | V_2/V_1^X |
|--|---|-------------|---|-------------------------|-------------|
| $\text{C}_2\text{H}_5\text{-CH}_2\text{-}$ | - | 1,0 | $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{-}$ | - | 0,36 |
| $\text{CH}_3\text{-}$ | - | 0,36 | $\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-}$ | - | 0,16 |
| $\text{C}_2\text{H}_5\text{-}$ | - | 0,65 | $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{-}$ | - | 0,05 |
| $n\text{-C}_3\text{H}_7\text{-}$ | - | 0,81 | $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{-}$ | Phe | 1,0 |
| $n\text{-C}_4\text{H}_9\text{-}$ | - | 0,83 | $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{-}$ | β -Phe | 1,0 |
| $\text{cyclo-C}_6\text{H}_{11}\text{-}$ | - | 0,70 | $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{-}$ | $\epsilon\text{-AMM}^1$ | 1,0 |
| $1\text{-C}_4\text{H}_9\text{-}$ | - | 0,53 | $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{-}$ | β -Ala | 1,35 |
| $1\text{-C}_3\text{H}_7\text{-}$ | - | 0,42 | $t\text{-C}_4\text{H}_9\text{-}$ | $\gamma\text{-AMM}^2$ | 1,43 |

V_1 - скорость гидролиза Z -Phe-His-Leu ; V_2 - скорость гидролиза соответствующего пептида.

¹ Амнокпроновая кислота; ² Амлинсоемная кислота.

Строение n -видовой блокирующей группировки, оказывающее существенное влияние на скорость расщепления пептидов, почти не влияло на гидролиз тетрапептидов (табл.3). Это указывает на относительно небольшой вклад участка E_3 активного центра фермента в

связывание субстрата.

Снижение скорости гидролиза пептидов с увеличением их длины, возможно, обусловлено в какой-то мере присутствием остатка пролина. Во всяком случае, пептиды, содержащие вместо пролина фенилаланин или другие аминокислоты (табл.3 и 4), гидролизировались с той же скоростью, что и трипептид Z-Phe-His-Leu. Хотя А I гидролизуются примерно в 10 раз медленнее, его K_M (48 мкМ) была близка K_M гидролиза его С-концевого трипептида (57 мкМ).

Таблица 4

Гидролиз С-концевых фрагментов ангиотензина I

| Пептиды | v_2/v_1 |
|-------------------------------------|-----------|
| Phe-His-Leu | 1 |
| Z-Phe-His-Leu | 1 |
| Pro-Phe-His-Leu | 0,4 |
| Z-Pro-Phe-His-Leu | 0,4 |
| Z-Val-His-Pro-Phe-His-Leu | 0,13 |
| Ангиотензин I | 0,1 |
| t-Boo-Pro-Phe-His-Leu | 0,1 |
| t-Boo-Gly- β -Ala-Phe-His-Leu | 1,15 |

Известно, что многие протеолитические ферменты проявляют эстеразную активность. Для выяснения действия Кк на эфирную связь использовали пептиды (синтезированы Позднеевым В.Ф.), содержащие Phe(NO₂). О степени их гидролиза судили по освобождению Z-Phe(NO₂), количество которого регистрировали по поглощению при длине волны 306-308 нм. Введение нитрогруп-

пы не изменяло K_M гидролиза пептида (табл.5), но снижало примерно на 30% относительную скорость его гидролиза по сравнению с аналогом, не содержащим эту группу.

Поскольку синтезированные пептиды, за исключением Z-Phe(NO₂)-His-Leu, ранее исследованы не были, мы изучали их спектры, pH-оптимум их гидролиза Кк и кинетические константы.

Увеличение оптической плотности проб при инкубации Кк с депептидом Z-Phe(NO₂)-OAla-Gly указывало на расщепление эфирной связи. Специфичный ингибитор Кк тепротид при разных концентрациях ($1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-9}$ М) тормозил расщепление депептида в такой же степени, как и пептидных субстратов. Эти данные свидетельствуют, что сложно-эфирная связь гидролизует Кк и что депептид связывается с ферментом аналогично пептидам. Дополнительные доказательства идентичности связывающего и каталитического механизмов при гидролизе эфирной и пептидной связи были получены Kurog et al., 1960, одновременно с ними сообщившими о расщеплении эфирной связи Кк. Введение эфирной связи в субстрат в месте расщепления его Кк уве-

личивало K_M и $V_{\text{макс}}$ ферментативной реакции (табл.5).

Гидролиз пептидов, содержащих нитрогруппу Таблица 5

| Пептиды | pH опт. | Длина волны нм | $\Delta \bar{\epsilon} \left(\frac{\Delta \text{оп}}{M} \right)$ | K_M , мМ | $V_{\text{макс}}$ |
|----------------------------------|---------|----------------|---|------------|-------------------|
| Z-Phe(NO ₂)-OAla-Gly | 7,0 | 306 | 960 | 1,75 | 0,25 |
| Z-Phe(NO ₂)-Ala-Gly | 7,0 | 306 | 1000 | 0,177 | |
| Z-Phe(NO ₂)-Ala-Pro | 7,4 | 308 | 816 | 0,077 | |
| Z-Phe(NO ₂)-His-Leu | 7,4 | 306 | 1080 | 0,065 | 0,025 |
| Z-Phe-His-Leu | 7,4 | - | - | 0,057 | |

Гидролиз физиологических пептидов ангиотензина I и брадикинина. Кк, отщепляя C-концевые дипептиды от А I и Бк, превращает физиологически неактивный А I в А II, оказывающий сильное прессорное действие, и разрушает Бк, являющийся антагонистом А II по действию на АД. Идентификация продуктов реакции с помощью хроматографии в тонком слое силикагеля КСК и на пластинках "Силуфол цу -254" показала, что в А I Кк разрывает одну пептидную связь. В результате освобождается дипептид His-Leu и образуется А II (рис.1), который не подвергается дальнейшему гидролизу Кк. Такая особенность действия Кк обусловлена структурой ангиотензина и каталитическими свойствами фермента и свидетельствует в пользу его биологической роли в образовании А II. Образование прессорного А II было подтверждено в биологических исследованиях по повышению АД у крыс (согл. с Гуртоенно В.М.). При блокировании действия Кк добавленным ЭПТА (5 мМ) образования А II и His-Leu не наблюдалось.

Основываясь на специфичности действия Кк на пептиды, а также на имеющихся в литературе сведениях относительно существования в крови (Jang, Grady, 1967) и почках (Grady, Jang, 1967) фермента, инактивирующего Бк путем отщепления C-концевого дипептида Phe-Sar, мы предположили возможность участия Кк в разрушении Бк. Как было показано при биологических исследованиях на изолированном роге матки крысы (согл. с Егоровой Т.Н.), Кк вызывает инактивацию Бк. Степень инактивации Бк нарастала с увеличением количества фермента или продолжительности инкубации. Некогда инактивация Кк нагреванием или в присутствии ЭПТА разрушила Бк не наблюдалось. Присоединение марболаксативина, другого фермента, разрушающего Бк, позволило, в.к. его субстрат His-Leu, не распавшись последующим про-

паратом Кк даже при длительной инкубации.

Хроматографические исследования показали, что от Бк (двумерная хроматография на пластинках "Силуфол UV-254") и от его С-концевого пентапептида (одномерная хроматография) под действием Кк происходит последовательное отщепление двух дипептидов.

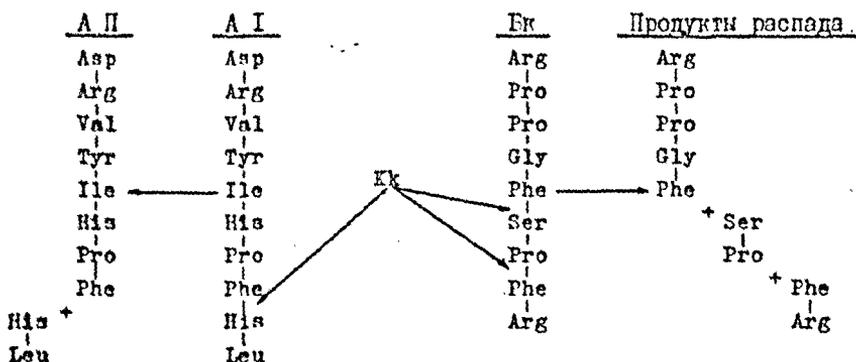


Рис. I. Схема действия карбоксикапепсина на ангиотензин и брадикинин.

Таким образом, впервые было показано, что эти две биологически важные реакции осуществляются одним ферментом. Физиологически его действие направлено на повышение АД. Образую гипертензивный А II и инактивируя гипотензивный Бк, Кк может регулировать их концентрацию в крови и тканях. Соотношение же этих вазоактивных пептидов, отличающихся противоположным действием на стенку сосудов и водно-солевой обмен, во многом определяет состояние сосудистого тонуса и уровень АД.

До наших исследований превращение А I в А II и разрушение Бк рассматривались как функции индивидуальных ферментов (ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) и кининазы II (К II)), относящихся к разным системам - прессорной РАС и депрессорной ККС, непосредственно между собой не связанным.

Сопоставление полученных нами экспериментальных данных с теми немногочисленными сведениями, что имелись в литературе о свойствах ферментов, описанных как АПФ (Skeggs et al , 1956; Bakhlo, 1968) и К II (Jang, Erdos, 1967) привело нас к заключению, что в организме существует не два разных специфических фермента, а один, сочетающий в себе их функции (образование А II и инактивацию Бк). И этот фермент является одновременно компонентом РАС и ККС. Следовательно, было выявлено связующее звено между двумя физиологическими системами

ми, участвующими в регуляции кровообращения. Участие Кк в метаболизме вазоактивных пептидов А II и Бк, оказывающих противоположное действие на гемодинамику, позволило выдвинуть принципиально новое представление о его ключевой роли в функционировании этих систем. Обнаружение второго связующего эти системы звена – калликреина (Sealy et al., 1978) не противоречило выдвинутому нами положению. Калликреин, выполняя индукторную роль, активизирует обе системы (рис.2). Суть ключевой роли Кк состоит в том, что уровень его активности определяет конечный эффект. Так, при повышении его активности преобладает действие РАС, при снижении – действие ККС.

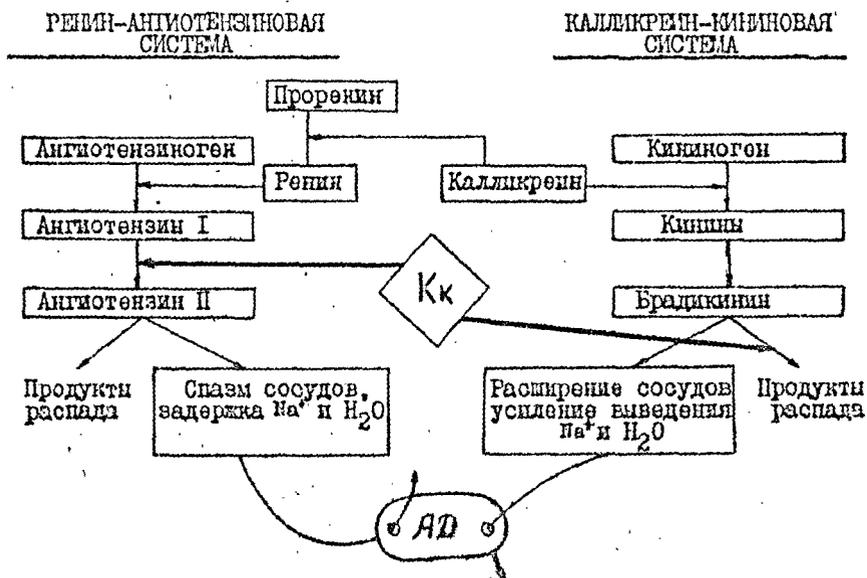


Рис.2. Схема ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем и их взаимосвязь.

Наши данные о том, что один и тот же фермент участвует в образовании А II и разрушении Бк, были подтверждены рядом исследователей; в частности в práci они являются общепризнанными (Soffer, 1976, 1981; Brady, 1986; Ondetti, Siskman, 1986; Гомазков, Трапезникова, 1978; Шевц, 1981). В 1970 г. практически одновременно с нами (Власова и др., 1970) появилось предварительное сообщение из лаборатории Эрдоша (Lang et al., 1970), что частично очищенный (в 200 раз) препарат К II из плазмы крови человека превращал А I в А II. Впоследствии препарат фермента, после чего смогли с

достоверностью показать, что он проявляет не только кининазную, но и ангиотензин-превращающую активность, они получили позднее (Igio et al. , 1972). В лаборатории Скеггса, обнаружившего АП II в 1956 г., частичная (в 70 раз) очистка фермента была проведена только в 1970 г. (Dorer et al. , 1970), а высокоочищенный препарат его получен в 1972 г. (Dorer et al. , 1972). О действии же его на Бк они сообщили еще позже (Dorer et al. , 1974).

Окончательное подтверждение, что обе эти реакции и в организме осуществляются одним ферментом и что этот фермент выполняет существенную роль в контроле содержания А II и Бк и уровня АД, было получено при введении в организм высокоспецифичных ингибиторов этого фермента (Igio et al. , 1972; Miller et al. , 1972; Neel et al. , 1980; Antonaccio, Cushman, 1981; Overlack et al. , 1981).

Согласно нашим данным, подтвержденным другими исследователями (Dorer et al. , 1974; Bunning et al. , 1983), Бк отличается большим сродством к Кк, чем А I. При эквимоллярной концентрации (0,05 мМ) он подавлял отщепление His-Leu от А I на 94% (табл.7) (по данным Chiu et al. - на 95%). Учитывая, что концентрация Бк в плазме выше концентрации А I примерно в 30 и более раз, можно предполагать, что Бк, как конкурентный субстрат, может оказывать влияние на образование А II. По имеющимся данным, практически весь А II, находящийся в плазме, образуется при участии Кк (Ondetti, Cushman , 1986). При торможении его активности большими дозами ингибиторов содержание А II в плазме не поддавалось определению (Oranil et al. , 1979; Unger et al. , 1986; Campbell, 1987).

Что касается инактивации Бк, то хотя в этом процессе в организме участвуют несколько протеолитических ферментов, большая часть (около 70-80%) образующегося в организме Бк разрушается Кк (Briggs, 1976; Zoffer, 1976; Skeggs et al. , 1981).

В пользу существенной роли фермента в регуляции АД свидетельствует и характер его распределения в организме. В сосудах он присутствует в двух формах: свободной, циркулирующей в крови, и мембранно-связанной, расположенной на обращенной внутрь сосуда поверхности эндотелиальных клеток (Duan et al. , 1975), что обеспечивает ему тесный контакт с веществами, находящимися в крови. Кроме того, он обнаружен на поверхности эпителиальных клеток, расположенных в местах интенсивного кровотока и соли, а также ряда других (Briggs , 1986; Ward et al. , 1977; Defendini et al. , 1983).

Торможение активности карбоксикатесаина. Анализ результатов торможения активности Кк неспецифическими ингибиторами различной природы (табл.6) дал основание отнести его к группе металлоферментов. Проведенная серия экспериментов по выяснению влияния ионов различных металлов на активность нативного Кк и его неактивного апофермента, полученного после обработки ЭДТА, позволила предположить присутствие в активном центре цинка или кобальта. Позднее рядом исследователей было установлено, что в его активном центре содержится атом цинка (Das 1975; Fernley, 1977).

Таблица 6. Торможение активности карбоксикатесаина почек неспецифическими ингибиторами

| Ингибитор | Концентр. (мМ) | Торм. (%) | Ингибитор | Концентр. (мМ) | Тормож. (%) |
|-------------------|----------------|-----------|--------------------------------|----------------|-------------|
| ЭДТА | 0,0005 | 48 | ПХМБ | 0,1 | 0 |
| " | 0,005 | 100 | H ₂ Cl ₂ | 1 | 100 |
| I,10-фосфантролин | 1 | 100 | CaSO ₄ | 0,1 | 70 |
| Цитрат натрия | 10 | 34 | " | 1 | 100 |
| " | 25 | 100 | CaCl ₂ | 1 | 60 |
| Цистеин | 10 | 100 | Мочевина | 600 | 50 |
| ДЭО | 1 | 0 | " | 2000 | 97 |

При исследовании торможения активности Кк различными пептидами (часть из них представлена на табл.7) были выявлены некоторые закономерности. Для связывания ингибиторов, как и субстрата, требуется свободная концевая карбоксильная группа. Эти данные получали подтверждение в работах Сильман, Onofetti, (1980). Достаточно эффективными ингибиторами оказались аналоги субстрата со свободной N-концевой аминогруппой и с D-набором аминокислотного остатка в положении P₁ (но не P'₁), но гидролизываемые Кк. Вызывать торможение активности Кк могут и дипептиды со свободными концевыми группами.

Обращает на себя внимание, что все пептиды, содержащие остаток пролина в положении P'₁, тормозили активность Кк. Это свободное функциональное место имеет функциональное значение, поскольку в таких пептидах относительно образуются в организме А II, А III (сер-леу¹-А II), фрагмент B₁ Ser-Pro-Phe, а также пептида А II, обнаруженные в моче мочы (Onofetti et al., 1971). Следует отметить, что свободные торможения реакцией гидролиза А II в присутствии А II была замедлена, как и гидролиза его C-концевого остатка (Уильямс). Цинком или кобальтом торможение кобальта на

гидролиз этих субстратов оказывал и Бк (табл. 7).

Таблица 7. Торможение активности карбоксипептина почек и легких пептидами и ядами змей

| Пептиды | Концент: мг/л | Торможение в % | |
|--|------------------|--------------------------|-----------------|
| | | карбоксипептина почек | легких |
| Gly-Pro-Pro | 190 | 65 | 61 |
| Gly-Pro-Ala | 200 | 54 | 43 |
| Gly-Pro-Gly | 200 | 57 | 45 |
| Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly | 200 | 49 | 47 |
| Z-Gly-Pro-Gly-Gly-Pro-Gly-OCH ₃ | 100 | 0 | 0 |
| Phe-His-Leu | 50 | - | 85 |
| t-Вос-Phe-His-Leu | 100 | 0 | - |
| Z-D-Phe-His-Leu | 50 | 45 | 44 |
| " | 100 | 90 | - |
| t-Вос-D-Phe-His-Leu | 100 | 0 | - |
| Z-Phe-D-His-Leu | 100 | 0 | - |
| Апиготонзин II | 10 | 24 ^X | 24 ^X |
| " | 10 | - | 28 |
| " | 50 | 63 | 43 |
| Брадикинин | 0,5 | - | 50 |
| " | I | 72 | 71 |
| " | 10 | 96 | 96 |
| " | 50 | 92 ^X | 94 ^X |
| 23 Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys (фрагмент Б-цепи висулина) | II | - | 50 |
| (фрагмент Б-цепи висулина) | 50 | 81 | 92 |
| Яд | мкг/мл | | |
| Эфи (<i>Echis carinatus</i>) | 2,5 | 51 | 35 |
| | 5,0 | 60 | 46 |
| | 25 | 84 | 82 |
| | 50 | - | 100 |
| Кобри (<i>Naja oxiana</i> Viehwald) | 25 | 69 | 72 |
| | 50 | 87 | 85 |
| | 500 | 97 | 96 |
| Гадюки (<i>Vipera ursini renardi</i>) | 500 | 30 | 38 |
| | 1000 | 50 | 47 |
| Панмориника (<i>Akistrodon halus</i>) | 1000 | 28 | 30 |

^XТорможение гидролиза А I (50 мг/л). Во всех остальных опытах субстратом служил Z-Phe-His-Leu (50 мг/л).

Кл предварительно инкубировали в течение 20 мин. с пептидами или 30 мин. с ядами. Бк добавляли одновременно с субстратом.

При исследовании действия на Кк ядов некоторых змей, обитающих в Средней Азии, было обнаружено, что в яде кобры и эфы содержатся ингибиторы Кк (табл. 7). Из яда эфы в результате частичной очистки были получены фракции ингибиторов примерно в 200 раз более активные, чем цельный яд. Это низкомолекулярные соединения (молекулярная масса около 1000-3000 Д) пептидной природы.

Взаимосвязь структуры и действия пептидных ингибиторов на Кк исследовали, используя серию новых аналогов пептидов sq-20475 ($\text{pGlu-Lys-Trp-Ala-Pro}$) и тепротида ($\text{pGlu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ile-Pro-Pro}$) с заменами аминокислотных остатков в N- и C-концевой части пептидов (синтезированы Равдель Г.А., Крит Н.А., Филатовой М.П.), а также аналогов Бк, в которых остатки пролина были замещены на его 4-х членный аналог - азетидин-2-карбоновую кислоту ($\text{ase}^2\text{-Bk}$, $\text{ase}^{2,3}\text{-Bk}$, $\text{ase}^7\text{-Bk}$, $\text{ase}^2\text{-ase}^7\text{-Bk}$), синтезированных на кафедре биохимии Римского университета. Было определено, что тепротид - конкурентный ингибитор; K_1 -14 нМ, I_{50} -10 нМ. Для sq-20475 характерен смешанный тип торможения, K_1 -140 нМ, I_{50} -300 нМ. Все изменения в структуре исследованных пептидов (кроме аналогов Бк с заменами во 2-м и 3-м положениях, тормозящих Кк сильнее, чем Бк) приводили к повышению I_{50} . Наиболее сильное снижение тормозящей активности пептидов отмечалось у аналогов с заменами на обоих концах. Изменения на аминокислотном конце монопептидов тепротида и Бк оказывали существенное влияние на их тормозящее действие, хотя и более слабое, чем изменения на С-конце.

Полученные результаты указывают на то, что остатки аминокислот, достаточно удаленные (на расстоянии 5-6 остатков) от расщепляемой связи, вносят значительный вклад в общее связывание пептида. Это согласуется с выдвинутым Haggis & Wilson (1963) предположением о протяженности субстрат-связывающего участка активного центра, на котором может располагаться 10-членный пептид.

II. Изменения активности карбоксилэстеразы в крови людей и животных.

Разработка метода определения активности Кк в сыворотке.

Методы определения активности Кк в тканях, применявшиеся в начале 70-х гг. не годились для определения его активности в сыворотке. Спектрофотометрические методы, не говоря уже о биологических (Bathle, 1974), отличались недостаточной высокой

чувствительностью. Високочувствительные радиометрические методы были довольно сложны, требовали большой затраты времени и вследствие этого были непригодны для серийных определений.

Основываясь на работах Gregerman (1967) и Piquilloud et al., (1970) мы разработали условия определения активности Кк в сыворотке крови человека. В качестве субстрата использовали N-замещенный C-концевой трипептид A I 2-Phe-His-Leu. Метод основан на свойстве гистидина, имеющего свободную аминогруппу, реагировать в щелочной среде с о-фталевым диальдегидом с образованием флюоресцирующего продукта. В условиях опыта при инкубации субстрата с сывороткой в нем расщеплялась только одна связь -Phe-His- и освобождался дипептид His-Leu. Об этом свидетельствовали данные хроматографии на бумаге и в тонком слое и спектры флюоресценции. Дальнейшего гидролиза образовавшегося дипептида не наблюдалось. Зависимость этого процесса от ионов хлора и полное торможение в присутствии ЭДТА (20 мМ) свидетельствовало о том, что реакции отщепления His-Leu осуществляется только Кк, без участия других протеолитических ферментов, находящихся в сыворотке.

Были проведены исследования зависимости скорости гидролиза субстрата от pH, времени инкубации (от 30 мин. до 4-х час.), количества сыворотки (0,75-7,5 мкл) и концентрации субстрата в пробе (2,5-60 мМ), и установлены оптимальные условия определения активности Кк. В этих условиях низкомолекулярные соединения сыворотки, содержащие свободные аминогруппы, не влияли на флюоресценцию проб, что, очевидно, объясняется малым содержанием сыворотки в пробе. Количество обнаруживаемого His-Leu составляло 93-97%.

В результате был предложен простой специфичный и высокочувствительный метод, позволяющий определить активность Кк в 3 мкл сыворотки. Этот метод использовали в ряде клиник страны. Ближайший к нему метод был предложен несколько позднее Fridland & Silverstein, (1976). Различные модификации этого флюориметрического метода используются и в настоящее время исследователями во всем мире.

На основании исследований сыворотки 97 доноров и стандартной человеческой сыворотки полученный диапазон был установлен уровень активности Кк у человека в норме: $141 \pm 9,5$ нмоль His-Leu \cdot мл⁻¹ \cdot мин⁻¹, $\bar{x} \pm 3,7$.

Активность карбоксикапепсина при гипертонии. При исследовании активности Кк в сыворотке (рис.3) больных рено-васкулярной гипертонией и гипертонической болезнью (совместно с Рагнер Н.А., Герасимовой Е.Н., Некрасовой А.А., Институт кардиологии АМН СССР) было обнаружено, что в группах больных с более высоким уровнем АД (рено-васкулярная гипертония - 130/90-270/150 мм рт.ст. и гипертоническая болезнь со стабильным течением (II Б стадия) - 130/90 - 220/150 мм рт.ст.) наблюдалась более низкая активность Кк, причем самые низкие значения активности отмечались у больных с наиболее высоким уровнем АД. У больных с лабильными формами гипертонической болезни и более низким АД (стадия I Б - 110/90 - 150/100 мм рт.ст. и II А - 135/75 - 170/100 мм рт.ст.) средняя активность Кк была близка к нормальной. В группе больных с пограничной формой гипертонической болезни (обследованы совместно с Соколовой Л.А., Ленинградский медицинский институт), у которых АД находилось на верхней границе нормы, но отличалось очень высокой лабильностью, уровень активности Кк был повышен.

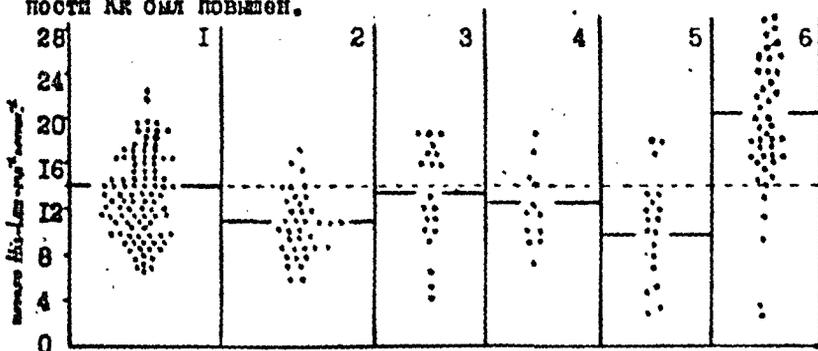


Рис.3. Активность карбоксикапепсина сыворотки. 1 - доноры (97 чел.); 2 - рено-васкулярная гипертония (32 чел.); 3-5 - гипертоническая болезнь: 3-I Б стадия (17 чел.); 4-II А стадия (10 чел.); 5- II Б стадия (15 чел.); 6 - пограничная форма гипертонии (45 чел.).

При исследовании у больных разных групп (исключая пограничную форму) влияния физической нагрузки или фуросемида обнаружилось, что во всех группах чем устойчивее уровень АД, тем менее выражены колебания активности Кк. При отсутствии изменений со стороны АД уровень активности также оставался без изменений. Он не менялся и у больных группы I Б и II А с уровнем АД близком к нормальному.

Полученные результаты дали основание предполагать, что снижение активности Кк сыворотки у больных гипертонией может являться компенсаторной реакцией организма в ответ на повышение АД. Возможно, что Кк сыворотки в какой-то мере отражает (Velletri & Bean, 1932; Unger et al., 1965) изменения, происходящие с мембранно-связанным ферментом, которому отводится основная роль в регуляции АД (Unger et al., 1981; Waesbor et al., 1980).

В пользу предположения об участии Кк сыворотки в адаптационных процессах свидетельствуют результаты, полученные в дальнейшем при клинических исследованиях (совм. с Соколовой Л.А.) и в эксперименте на животных (совм. с Шварцем Г.Я., ВНИКИ; Молчановой Л.В., Лаборатория общей реаниматологии АМИ СССР). Так, в период становления у крыс ренальной гипертонии, развивавшейся после оперативного вмешательства, постепенное повышение АД сопровождалось постепенным снижением активности Кк. При торможении Кк введением его специфического синтетического ингибитора кантоприла у больных с пограничной формой гипертонии и у крыс гипертонивных (ренальная гипертония) и нормотонивных, находившихся на низкосолевой диете, на фоне снижения АД наблюдалось увеличение содержания Кк в крови. У собак при экстремальных состояниях, когда наблюдаются резкие колебания АД на протяжении короткого промежутка времени (3-6 часов), отмечались противоположно направленные изменения активности Кк и АД.

Изменения активности карбоксикапаза плазмы у собак в предсудорожном периоде. Опыты проводились на трех группах собак, у которых создавались разные модели терминального состояния, вызванного различными воздействиями на организм, с последующим оживлением животного. В период клинической смерти и в первые часы восстановительного периода у них регистрировался уровень АД и через определенные промежутки времени определяли активность Кк плазмы (рис.4).

Полученные результаты показали, что несмотря на принципиально различия в причинах, вызвавших состояние терминальной смерти как только окончание жизни, характер соотношения между АД и активностью Кк был одинаков во всех трех группах животных. Как видно на рис.4, на котором представлены индивидуальные данные АД и активности Кк карбоксиказы плазмы каждой группы опытов, между этими показателями четко наблю-

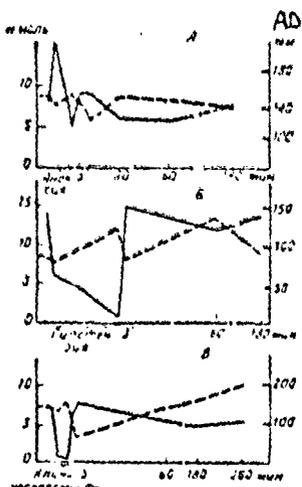


Рис. 4. Изменения АД и активности Кк в плазме крови собак при терминальных состояниях и в период восстановительного периода.

А - компрессионная ишемия мозга длительностью - 20 мин; Б - гипотензия в течение 2 час., вызванная кровопотерей с последующим острым кровопусканием, приводящим к смерти (длит. - 2 мин); В - электротравма, клиническая смерть длительностью 10 мин; АД — , мм рт. ст.; активность Кк — — — , ммоль/л.

дается отрицательная корреляция. Так например, период клинической смерти организма характеризовался повышением активности фермента, что должно вести к увеличению образования А П, и направлено на восстановление сосудистого тонуса. Kouyunoğlu (1984) наблюдал существенное увеличение активности фермента в легких крыс при геморрагическом и других видах шока, а Trachte (1978) - резкое увеличение (в 12 раз) содержания А П в плазме кошек при геморрагическом шоке.

Ш. Факторы регуляции активности карбоксипептина в организме.

В организме постоянная регуляция активности ферментов осуществляется во многом благодаря взаимодействию ферментов с их эндогенными ингибиторами или активаторами. О механизмах, участвующих в контроле активности Кк в организме, до настоящего времени практически ничего не известно.

Нам были обнаружены ингибиторы Кк в крови и лейкоцитах (нейтрофилах и моноцитах) человека и бика, в синовиальной жидкости больных артритами, а также в почках и легких бика. Это низкомолекулярные соединения пептидной природы. Данные относительно присутствия ингибиторов в почках и легких бика были подтверждены Lieberman & Sastre (1983), которые показали, что ингибиторы фермента содержатся в этих и во многих других тканях человека. Присутствие низкомолекулярных ингибиторов в крови было подтверждено Nalato et al. (1986).

Ингибиторы, находящиеся в крови, легко могут контактировать как с растворенным, так и с мембранно-связанным ферментом, расположенным на поверхности эндотелия, и влиять на тонус сосудов и уровень АД. Известен ряд состояний, сопровождающихся снижением активности обеих форм Кк, как например, при гиоксин (Davidson & Stalcup, 1984; Szidon et al., 1980), при воспалительных процессах в легких (Fourrier et al., 1986) и др. В пользу предположения, что в ряде случаев снижение активности Кк может быть обусловлено взаимодействием его с образующимися в организме ингибиторами, говорят полученные нами данные. У больных с респираторным дистресс-синдромом (характеризующимся скоплением нейтрофилов в легких), у которых активность Кк находилась на низком уровне (1,2-4,4 нмоль $\text{His-Leu} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) содержание ингибиторов в крови было существенно выше, чем у здоровых доноров.

На основании хорошо известных данных о повышении содержания Бк в очаге воспаления и об активном участии различных видов лейкоцитов в развитии и поддержании воспалительного процесса возникло предположение о возможности присутствия в этих клетках ингибиторов Кк. Поскольку в организме Кк является основным ферментом, инактивирующим Бк, торможение его активности может быть одним из механизмов, обеспечивающих увеличение концентрации Бк.

При исследовании лизатов нейтрофилов и моноядерных лейкоцитов, полученных из крови доноров, было обнаружено, что они тормозят активность Кк почек. Лизаты нейтрофилов тормозили Кк примерно в два раза слабее, чем лизаты мононуклеаров. Было показано, что наблюдаемое снижение активности Кк не является следствием его разрушения протеолитическими ферментами лейкоцитов. В условиях опыта не происходила инактивация Кк или расщепления субстрата (Z-Phe-His-Leu) или продукта гидролиза (His-Leu) лизатами обоих видов лейкоцитов или их ультрафильтратами, прошедшими через мембрану UM-2 ("Амикон"). Ингибиторы, содержащиеся в нейтрофилах и моноядерных лейкоцитах, являются термо- и кислотоустойчивыми плазмокотактулярными соединениями гоптидной природы. Инкубация с трансном или хитозаном приводила к существенному снижению (на 75-80% и 45-65%, соответственно) их ингибирующей активности при одновременном проросте активности; причем существенно тормозящего действия ингиби-

торов из нейтрофилов было выражено слабо.

Полученные данные позволяют предполагать участие Кк в воспалительных реакциях организма. Это согласуется с мнением Di Rosa et al., (1985), которые рассматривают вызываемое глюкокортикоидами увеличение биосинтеза Кк как один из механизмов, обеспечивающих их противовоспалительное действие.

В качестве примера образующейся при воспалении жидкости, в которой отмечается и повышенное содержание Бк (Веремеенко, 1977) была исследована (совместно с Джакомелло А., Салерно К., кафедре биохимии Римского университета) синовиальная жидкость (СЖ), полученная из суставов (локтевого и коленного) больных различными формами артритов; находящиеся в ней клетки удаляли центрифугированием. Следует отметить, что в СЖ всех больных были обнаружены не только ингибиторы Кк, но и сам фермент. Присутствие в ней Кк (о чем не было известно ранее) было подтверждено в опытах с использованием его специфического ингибитора тироптида, полностью тормозившего гидролиз субстрата. Источником Кк, находящегося в СЖ могут быть и моноциты и макрофаги, которые способны синтезировать этот фермент и выделять его в окружающую среду (Friedland et al., 1978; Fyhngquist et al., 1983), в особенности в присутствии лимфоцитов (Lauderdale & Rohrbach, 1986). На возможность такого происхождения Кк указывают и наши данные; клетки, полученные из СЖ содержали Кк. Однако, не исключается возможность попадания его из плазмы, тем более, что при воспалении проницаемость сосудов повышается. Торможение активности Кк почечным ультрафильтратом (мембрана РМ-30, "Амискон") разведенной СЖ на 40-50% указывало на относительно высокое содержание в ней ингибиторов. Можно полагать, что присутствие Кк и его ингибиторов характерно не только для СЖ. Мы, обнаруживали оба компонента и в бронхиальной жидкости, полученной при бронхоскопии больных с респираторным дистресс-синдромом.

Присутствие ингибиторов в жидкостях, образующихся в результате воспалительных процессов, также дает основание предполагать их определенную роль при воспалении. Они могут освобождаться из нейтрофилов или вследствие сокращения активированных клеток или/и в результате их гибели, а также из коллагена соединительной ткани, усиление распада которой наблюдается при воспалении. Bahika et al. (1979) показали, что пептиды, продукты распада коллагеновых тканей, тормозят активность Кк.

Обнаружение ингибиторов Кк в нейтрофилах дало нам основательно предложить гипотезу, позволяющую объяснить механизм влияния нейтрофилов на проницаемость сосудов при воспалении. До настоящего времени, несмотря на многочисленные исследования и ряд предположений (Lewis & Granger, 1986; Оглоблина, 1988), остается неясным как именно вещества ответственны за воздействие нейтрофилов на эндотелиальные клетки, приводящее к пролонгированию действия Бк и простагландинов, расширения сосудов и увеличения проницаемости. Предлагаемая гипотеза может, по крайней мере частично, восполнить этот пробел. Косвенным подтверждением ее правильности служат данные ряда исследователей (Lindgren et al., 1987; Kosea et al., 1980; Iavsekutz et al., 1983; DiRosa et al., 1985; Snyder et al., 1985).

Торможение активности Кк, очевидно, не единственный путь пролонгирования эффекта Бк. Такая жизненно важная реакция организма, как защитная, должна включать ряд взаимно перекрывающихся механизмов ответа, обеспечивающих эту реакцию. Но снижение разрушения Бк вследствие торможения Кк эндотелиальных клеток ингибиторами, выделяющимися из находящихся поблизости нейтрофилов, — это наиболее продуктивный путь местного увеличения концентрации Бк, необходимого для развития воспаления, тем более, что Бк также может освобождаться у эндотелия (Nolly et al., 1986).

В процессе исследования своих нейтрофилов человека было обнаружено, что они выделяют в окружающую среду фактор, вызывающий активацию Кк. Степень активации зависела от концентрации клеток в суспензии, наибольшая активация (на 100%) наблюдалась при $5 \cdot 10^6$ клеток/мл. При блокировании Кк тиротридом глутарилза субстрата не наблюдалось. Проведение ряда различных вариантов эксперимента показало, что мы имеем дело с истинной активацией фермента и наблюдали его максимальный эффект. Фактор отличается термостойкостью, его молекулярная масса около 30 кД.

Обнаружение активатора Кк в нейтрофилах не противоречит данным относительно присутствия в них его ингибиторов. Во-первых, известно, что нейтрофилы могут продуцировать вещества противовоспалительного действия. Во-вторых, активированный Кк фактор обнаруживается в растворах, полученных из суспензии, содержащей $3 \cdot 10^5$ – $5 \cdot 10^3$ клеток/мл. При концентрации $3 \cdot 10^4$ клеток/мл эффект активации не наблюдался. Для получения этого, очевидно,

то максимальное торможение Кк, использовались суспензии с концентрацией нейтрофилов $7,8 \cdot 10^4$ клеток/мл; увеличение концентрации клеток приводило к снижению ингибирования полученным раствором. Эта особенность не находила объяснения, пока не был обнаружен активатор.

Подтверждение присутствия активатора в организме было получено при исследовании безбелковых центрифугатов сыворотки больных с наследственной недостаточностью С1-ингибитора системы комплемента, у которых в крови постоянно происходят активация нейтрофилов, наблюдается повышенная проницаемость капилляров и развитие отеков. Появление (или увеличение содержания) активатора в крови таких больных, по-видимому, также можно рассматривать как защитную реакцию организма. Определение активности Кк в сыворотке этих больных (32 чел.) показало, что она несколько снижена ($M \pm \sigma - 9,9 \pm 3,2$ нмоль $\text{H}_2\text{O} - \text{Leu} \cdot \text{мл}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$).

Совокупность полученных данных позволяет предполагать существование системы эндогенных ингибиторов и активаторов Кк, контролирующей его активность при различных физиологических и патологических состояниях. Изменение содержания этих веществ в отдельном участке или в циркулирующей крови может отражать, по крайней мере, два процесса: нарушение, способствующее развитию заболевания или, напротив, активизацию адаптационных реакций организма, стремящихся скомпенсировать возникшее нарушение.

III. Влияние торможения активности карбоксикапепсина в раннем постренимационном периоде на восстановление функций организма.

В начальном периоде реанимации наблюдаются глубокие расстройства кровообращения, сопровождающиеся спазмом сосудов и вторичной гипоксией, что может приводить к гибели тканей. Считая, что торможение активности Кк будет вызывать расширение сосудов и увеличение кровоснабжения органов и, в частности, мозга, мы предположили с целью ослабления или предотвращения осложнений, развивающихся в результате гипоксии тканей, использовать ингибитор Кк теопропид. Поскольку теопропид вызывает понижение АД, а каротидный, проводимый в период оживления, направлен на повышение АД, а затем на поддержание его на определенном уровне, то в начале исследований входило подобрать условия введения теопропида, при которых улучшается кровоснабжение органов, но не происходит снижения АД.

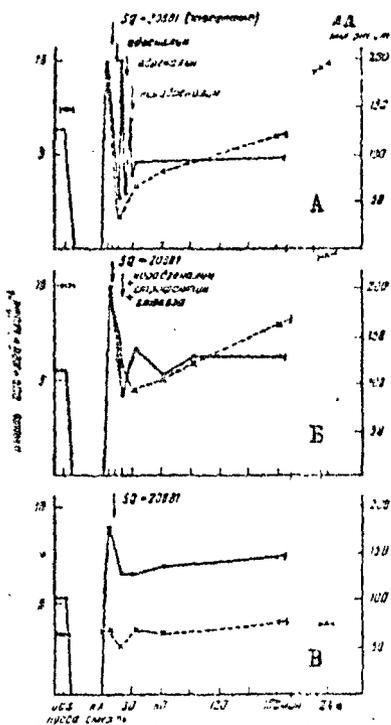


Рис. 5. Влияние продолжительности введения тепротида: А - в течение 5-7 мин; Б - 1 час; В - 3 часа. АД - артериальное давление; Kk - активность Kk плазмы. Нис-Leu - мкг - 1 час.

В экспериментах (совместно с Молгановой Л.В., Новодежской И.С.) на собаках, перенесших 17-ти минутную клиническую смерть, вызванную электротравмой, тепротид (синтезирован Крит Н.А., Филатовой М.П.) вводили (внутривенно) на 4-5 минуте восстановительного периода. Продолжительность введения варьировали от 5 мин. до 3-х часов. При одномоментном введении наблюдалось резкое падение АД, которое с трудом удалось стабилизировать повторными введениями адреналина и парадриналина (рис. 5 А). С увеличением времени введения тепротида происходило сглаживание кривых АД и активности Kk плазмы. Капельное введение тепротида в сочетании с реополиглюкином (для компенсации расширения сосудов дополнительным объемом жидкости) в течение 3-х часов, не сказываясь на общем АД (рис. 5В), вызвало увеличение скорости кровотока в 2-2,5 раза и улучшение кровоснабжения органов. Это приводило к улучшению конечных результатов реанимации. Все животные, получавшие тепротид и реополиглюкин, выжили, и у них отмечалось полное видимое восстановление неврологических функций. В контрольной группе собак, не получавших лечения, все животные погибли. В группу животных, получавших только реополиглюкин, выжило 70%, но у них отмечались задержки и неполное восстановление функций ЦНС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанным нами методом синтеза была получена высокоочищенная полифракционная протеиназа, обладающая всеми свойствами и названная карбоксикатоксином. Научные физико-химические и биологические свойства позволили выявить его характерные особенности и действие на физиологические пептиды А I и Бх.

Впервые было показано вопреки существовавшему предположению, что один и тот же фермент образует прессорный пептид А II и инактивирует депрессорный пептид Бк. На основе анализа собственных и литературных данных выдвинуто принципиально новое положение о взаимосвязи ренин-ангиотензиновой и калликреин-киназной систем в регуляции АД и о ключевой роли Кк в функционировании этих систем, оказывающих противоположное действие на АД. Предположение о ключевой роли фермента в дальнейшем послужило отправной точкой для создания высокоэффективных антигипертензивных средств, являющихся его ингибиторами. По данным ряда исследователей, в организме Кк является основным ферментом, образующим А II; разрушает большую часть эндогенного Бк и выполняет важную роль в регуляции АД.

Предложенный нами для клинических исследований простой специфичный и высокочувствительный метод определения активности Кк в сыворотке людей позволил установить пределы колебаний его уровня в норме и провести исследование его активности при различных патологических состояниях. Полученные результаты дали основание сделать вывод об участии Кк в адаптационных реакциях организма, направленных на восстановление нормального кровообращения. Кроме того, на основании полученных данных возникло предположение, что Кк принимает участие и в сложной комплексной реакции, составляющей защитную воспалительную реакцию организма.

Взаимодействие ферментов с их модуляторами является одним из путей регуляции их активности в организме, и можно предположить, что обнаруженные нами эндогенные ингибиторы и активатор(ы) Кк имеют физиологическое значение. Выявление эндогенных модуляторов служит основой для выяснения биохимических механизмов регуляции активности ферментов в организме и способов воздействия на них.

Тораземид Кк рассматривается на современном этапе как один из наиболее перспективных путей лечения гипертензивных состояний. В результате совместных с НИИХИ исследований, посвященных поискам кораральных ингибиторов Кк, был предложен эффективный препарат в качестве потенциального антигипертензивного средства. Практический интерес представляют и результаты применения ингибитора Кк при ревматизме.

ВЫВОДЫ

1. Изучение обнаруженного нами в коре почек быка протоолитического фермента карбоксипепсицина, который внесен в "Номенклатуру ферментов" под названием дипептидилкарбоксипептидаза А (КФ 3.4.15.1), привело к расшифровке его физиологической роли. Установлено, что он катализирует две биологически важные реакции: образование прессорного пептида А II и разрушение депрессорного пептида Бк, т.е. является одновременно компонентом ренин-ангиотензиновой и калликреин-кининовой систем. Единственная концепция о его ключевой роли в функционировании этих систем, в регуляции в крови и тканях концентрации А II и Бк, определяющих состояние сосудистого тонуса и уровень АД.

2. Разработан метод выделения высокоочищенного препарата Кк из почек и легких быка и исследованы физико-химические и энзиматические свойства обоих ферментов. Ферменты из почек и легких идентичны.

3. Изучение специфичности действия Кк на синтетические пептиды показало, что он а) отщепляет дипептиды с С-конца субстрата, имеющего свободную концевую α -карбоксильную группу; б) характеризуется широкой специфичностью: гидролизует пептиды различного строения; в) разрывает сложно-эфирную связь; г) не гидролизует связь, образованную иминогруппой пролина. Обнаружены и другие особенности действия Кк на пептиды.

4. Изучение гидролиза физиологических пептидов показало, что Кк, отщепляя С-концевой дипептид от физиологически неактивного декапептида А I, превращает его в повышающий АД А II, который не подвергается дальнейшему расщеплению и тормозит активность фермента. В то же время Кк вызывает инактивацию антагониста А II - Бк, отщепляя от него последовательно два дипептида. И образование А II и разрушение Бк подтверждено биологическими методами. Полученные данные послужили основой в расшифровке его роли в организме.

5. Исследование тормозящей активности Кк пептидами различного строения показало, что а) для взаимодействия ингибитора (как и субстрата) с ферментом важна свободная С-концевая карбоксильная группа; б) пептиды, содержащие остаток пролина в положении T_1 , являются ингибиторами; в) пептиды, содержащие более 5-6 остатков, по-видимому, связываются по двум участкам.

6. Разработаны условия для определения активности Кк в сыворотке крови человека высокочувствительным флуориметрическим

методом. Установлен уровень его активности у людей в норме. Исследована активность Кк у больных рено-васкулярной гипертензией и гипертонической болезнью, а также у собак при экстремальных состояниях и крыс в процессе становления экспериментальной ренальной гипертензии. Полученные данные, а также изменения содержания Кк в крови человека и крыс в ответ на торможение его активности каптоприлом позволили прийти к заключению об участии Кк сыворотки в защитных компенсаторных реакциях организма.

7. Обнаружены эндогенные низкомолекулярные ингибиторы Кк пептидной природы в крови и лейкоцитах (нейтрофилах и мононуклеарах) человека и быка, в синовиальной жидкости больных артритами, а также в почках и легких быка. Предложена гипотеза, позволяющая объяснить механизм влияния нейтрофилов на проницаемость сосудов при воспалении.

8. Обнаружен активатор Кк, выделяемый нейтрофилами человека в окружающую среду. Показано его присутствие в крови.

9. Исследование торможения активности Кк у собак в раннем периоде реанимации показало, что кашаловое введение его ингибитора теоприда в сочетании с реополиглобином вызывает существенное улучшение кровоснабжения и приводит к повышению выживаемости животных и снижению послеоперационных осложнений. Эти данные открывают перспективы использования ингибиторов Кк при реанимации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Елисеева Д.Е., Орехович В.Н. Выделение и изучение специфичности карбоксикаптепсина. // Докл. АН СССР. - 1963. - Т. 153, № 4, - С. 954-956.

2. Евтихина Э.Ф., Елисеева Д.Е., Должит Н.И., Орехович В.Н., Сирдарова К.Ф. Выделение, свойства и специфичность действия тканевых протениаз. // I-й Всесоюзный биохимический съезд. - 1964. - В. I - С. 84.

3. Elyseeva Yu. E., Orekhovich V. N. Characterization and specificity of action of carboxycathepsin. // VIth International Congr. Biochem., Abstracts. New York, - 1964. - V. 4-127. - P. 326.

4. Елисеева Д.Е. Протениаза почек - карбоксикаптепсин. // 2-й Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы секционных сообщений. - 1969. - С. 9.

5. Елисеева Д.Е., Орехович В.Н., Павлихина Л.Е., Алексеевко Л.П. Карбоксикаптепсин - ключевой фермент двух систем, регулирующих кровяное давление // Вспр. мед. химии. - 1970. - Т. 16, № 6. - С. 646-649.

6. Eliseeva Yu.E., Orekhovich V.N., Pavlikhina L.V., Alexeenko L.P. Carboxoatepsin - a key regulatory component of two physiological systems involved in regulation of blood pressure. // Clin. Chim. Acta. - 1971. - V. 31. - P. 413-419.

7. Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Орехович В.Н. Выделение карбоксикатепсина (пептидил-дипептидазы КФ 3.4.15.1) из почек быка. // Докл. АН СССР. - 1974. - Т. 217, №4. - С. 953-956.

8. Орехович В.Н., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В. Роль нейтральных протеиназ в регуляции сосудистого тонуса. // 3-й Всесоюзный биохимический съезд, Тезисы симпозиальных докладов, - 1974. - С. 305.

9. Орехович В.Н., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В. Значение тканевых протеолитических ферментов в регуляции ряда функций организма. // 17-й Всесоюзный съезд терапевтов. - 1974. Тезисы. - 1974. - Т. I. - С. 69-70.

10. Павлихина Л.В., Елисеева Ю.Е., Позднеев В.Ф., Орехович В.Н. Определение активности карбоксикатепсина (пептидил-дипептидазы) в крови человека. // Вопр. мед. химии. - 1975. - Т. 21, №1. - С. 54-60.

11. Орехович В.Н., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Иеговский В.А., Молчанова Л.В. Ферментативные основы регуляции сосудистого тонуса при экстремальных состояниях. // Физиология человека. - 1975. - Т. I, №2. - С. 310-316.

12. Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н., Павлихина Л.В. Свойства и специфичность действия карбоксикатепсина (пептидил-дипептидазы) почек быка. // Вопр. мед. химии. - 1976. - Т. 22, №1. - С. 81-89.

13. Егорова Т.П., Елисеева Ю.Е. Действие карбоксикатепсина на биологическую активность брадикинина. // Вопр. мед. химии. - 1976. - Т. 22, №1. - С. 119-122.

14. Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н., Павлихина Л.В. Карбоксикатепсин (пептидил-дипептидаза) легких: выделение и свойства. // Биохимия. - 1976. - Т. 41, №3. - С. 506-512.

15. Орехович В.Н., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В. Эпизимологические факторы регуляции сосудистого тонуса. // Вестн. АМН СССР. - 1976. №9. - С. 42-47.

16. Павлихина Л.В., Елисеева Ю.Е., Позднеев В.Ф., Орехович В.Н. Чувствительный флуориметрический метод определения карбоксикатепсина (пептидил-дипептидазы) в сыворотке крови человека по триптонгу ангикотонина I. // Современная методика в биохимии. - М., 1977. - С. 147-151.

17. Павлихина Л.В., Елисеева Ю.Е. Молекулярные формы пептид-дипептидазы - фермента, превращающего ангиотензин I в ангиотензин II. // 4-й Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы научных сообщений. - 1978. - Т. I. - С. 241.

18. Орехович В.Н., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Неговский В.А., Новодерякина И.С., Молчанова Л.В. Действие sq-20881, ингибитора карбоксикапепсина (ангиотензин I превращающего фермента) на периферическое кровообращение в раннем постреанимационном периоде. // Докл. АН СССР. - 1980. - Т. 250, №1. - С. 253-256.

19. Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Позднев В.Ф., Орехович В.Н. Встречаемая активность карбоксикапепсина (дипептидил-карбоксипептидазы, КФ 3.4.15.1) // Докл. АН СССР. - 1980. - Т. 254, №6, С. 1476-1478.

20. Giacomello A., Salerno C., Favella P., Elisseeva Yu. E., Pavlikhina L.V. Attività dell' enzima di conversione nei liquidi sinoviali infiammatori. // IV Congrès Latin de Rhumatologie., Liege (Belgique). Communication libres. - 1980. - P. 12.

21. Elisseeva Yu. E., Pavlikhina L.V., Orekhovich V.N., Giacomello A., Salerno C., Favella P. Evidence for the presence of dipeptidyl-carboxypeptidase and its inhibitors in inflammatory synovial fluids. // Biochim. Biophys. Acta. - 1981. - V. 658. - P. 165-168.

22. Шарвц Г.Я., Пасхина Т.С., Егорова Т.П., Павлихина Л.В., Елисеева Ю.Е. Влияние унитиола, а-пеницилламина и цистеина на биологические эффекты брадикинина и активности карбоксипептидазы и дипептидил-дипептидазы. // Химико-фармац. ж. - 1981. - №8. - С. 18-23.

23. Орехович В.Н., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В. Роль пептидаз в регуляции сосудистого тонуса. // Вестник АМН СССР. - 1982. - №9. - С. 34-38.

24. Позднев В.Ф., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Орехович В.Н. Влияние строения алкильного радикала уретановой блокирующей группировки на расщепление карбоксикапепсина три- и тетра-пептидных субстратов. // Биорганич. химия. - 1983. - Т. 9, №2. - С. 232-236

25. Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Козлова Н.И., Бароукова И.С., Орехович В.Н. Об ингибиторах карбоксикапепсина (ангиотензин I превращающего фермента), содержащихся в биологических жидкостях и лейкоцитах человека. // 4-й Всесоюзный симпозиум по молекулярной биологии, Алма-Ата, окт. 1983. - 1983. - Тезисы С. 98-99.

26. Орехович В.Н., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Крит Н.А., Филатова М.П. Пептиды-ингибиторы карбоксипептамина (пептидил-дипептидазы А) и их значение для клинической медицины. // Вопр. мед. химии. - 1984. - Т.30, №3. - С.51-56.

27. Орехович В.Н., Докшина Л.А., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В. Роль протеолитических ферментов в регуляции физиологических процессов. // Вестник АМН СССР. - 1984. - №3. - С.3-10.

28. Яхонтов Л.Н., Мастефанова Л.И., Евстратова М.И., Шварц Г.Я., Машинский М.Д., Турчин К.Ф., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Кузнецова Е.В., Орехович В.Н. Синтез и изучение ингибиторов дипептидил-карбоксипептидазы 3-меркапто ангилированных замещенных 2-пиперидинкарбоновых кислот. // Химико-фармац.ж. - 1984. - Т.18, №10. - С.1185-1190.

29. Филатова М.П., Крит Н.А., Басчастная Н.В., Блохина А.В., Козлова И.И., Павлихина Л.В., Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н., Рейсман Э., Штегелу И. Синтез и биологическая активность аналогов неонапептидного ингибитора пептидил-дипептидазы. // Биосфера.ж.ж. - 1985. - Т.11, №1. - С.21-30.

30. Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Орехович В.Н. Роль ренин-ангиотензиновой системы в норме и при гипертонической болезни. // 3-й Всероссийский съезд кардиологов. Свердловск, май 1985. Тезисы докладов. - 1985. - С.43.

31. Павлихина Л.В., Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н. Ингибиторы ключевого фактора ренин-ангиотензиновой системы, карбоксипептамина - новый класс гипотензивных средств. // там же. С.568-569.

32. Орехович В.Н., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В. Регуляторная функция карбоксипептамина (ангиотензин-преобразующего фермента) в организме. // 5-й Всесоюзный биохимический съезд. Тезисы основных докладов. - 1985. - Т.1. - С.83-89.

33. Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Орехович В.Н., Салерно К., Джакомелло А. Карбоксипептамина и его ингибиторы в синокардиальной циркуляции при стрессах. // там же, Тезисы стендовых сообщений. - Т.2. - С.264-265.

34. Шварц Г.Я., Грант В.Г., Кабанчикова С.И., Зартова А.М., Машинский М.Д., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Орехович В.Н. 3-(α -карбок)- β -метилен- α -амино-интрацислин, - ингибитор или пептидгидролазы, обладающая ангиотензиноподобной активностью // Биометрия. - 1986. - №3. - Авторское свидетельство № 1015573 от 19.12.83.

35. Шварц Г.Я., Евстратова М.И., Мустафанова Л.И., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Орехович В.Н., Кутаевская Е.В., Машковский М.Д., Яхонтов Л.И. Цис-1-(3-ацетилтиопропионил)-6-метил-пиперидиновой кислоты, обладающая антигипертензивной активностью, и способ ее получения.// Авторское свидетельство № 1184239 от 8.08.85.

36. Орехович В.Н., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В. Ультразвучное регулирование давления.// Наука в СССР. - 1987. - №5. - С.2-9.

37. Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Орехович В.Н. Биохимические механизмы регуляции артериального давления.// Клиническая медицина. - 1987. - №5. - С.9-19.

38. Кутаевская Е.В., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Орехович В.Н., Фармарк И.Ф., Шварц Г.Я. Индукция карбоксикапепсина (ангиотензин I превращающего фермента) плазмы крови нормотензивных и гипертензивных крыс в ответ на однократное введение калтоприла.// Бюллетень экспер. биол. мед. - 1987. - №1. - С.48-60.

39. Ураник В.Г., Шварц Г.Я., Гривик С.И., Тугушева Н.З., Фармарк И.Ф., Кутаевская Е.В., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Орехович В.Н., Машковский М.Д. Синтез и биологическое действие амидино-меркаптокислот и родственных соединений.// Химико-фармацевтический журнал. - 1987. - №12. - С.1428-1433.

40. Козлова Н.И., Павлихина Л.В., Елисеева Ю.Е., Орехович В.Н. Эндогенные ингибиторы карбоксикапепсина (ангиотензин I превращающего фермента) сыворотки крови быка.// Докл. АН СССР. - 1988. - Т.298, №6. - С.1481-1485.

41. Елисеева Ю.Е., Барсукова И.С., Орехович В.Н. Обнаружение ингибиторов карбоксикапепсина (ангиотензин-превращающего фермента) в лейкоцитах человека.// Докл. АН СССР. - 1988. - Т.302. - №4. - С.992-995.

42. Алексеенко Л.И., Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Позднеев В.Ф., Орехович В.Н. Действие амидино-меркаптокислот на активность пролилэндопептидазы и карбоксикапепсина (ангиотензин-превращающего фермента).// Докл. АН СССР. - 1989. - Т.306, №6. - С.1486-1489.

Список сокращений, использованных в автореферате:

Кк - карбоксикапепсин; АПФ - ангиотензин-превращающий фермент; К II - кининаза II; РАС - ренин-ангиотензиновая система; ККС - калликреин-кининовая система; А I - ангиотензин I; А II - ангиотензин II; Ек - брадикинин; АД - артериальное давление; ДФЭ - диэтилопропилфторфосфат; ПХМБ - параклоромеркурибензоат.

23