

УДК 577.152.341*51
©Коллектив авторов

ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ НОВОГО ПЕПТИДНОГО СУБСТРАТА ЭНДОТЕЛИН-ПРЕВРАЩАЮЩЕГО ФЕРМЕНТА

*Т.А. Гуреева, Е.В. Кугаевская, В.Ф. Поздnev, В.Н. Прозоровский,
Ю.Е. Елисеева, Н.И. Соловьева**

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва, 119121,
Погодинская ул. 10; тел.: (495) 246-5072; факс: (495) 245-0857; эл. почта:
Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

Новый гексапептид СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg использован в качестве субстрата для определения активностей как эндотелин-превращающего фермента (ЭПФ; КФ 3.4.24.71), так и ангиотензин-превращающего фермента (АПФ; КФ 3.4.15.1) и нейтральной эндопептидазы (НЭП; КФ 3.4.24.11). Для дифференцировки активностей этих ферментов были использованы специфичные ингибиторы: лизиноприл (для АПФ) и тирорфан (для НЭП).

Ключевые слова: СМС-гексапептид, эндотелин-превращающий фермент, ангиотензин-превращающий фермент, нейтральная эндопептидаза, ингибиторы.

ВВЕДЕНИЕ. Эндотелин-превращающий фермент (ЭПФ; КФ 3.4.24.71), ангиотензин-превращающий фермент (АПФ, КФ 3.4.15.1) и нейтральная эндопептидаза (НЭП; КФ 3.4.24.11) принимают участие в регуляции кровяного давления и водно-солевого обмена. Эти ферменты, относящиеся к мембраносвязанным цинк-содержащим металлопротеиназам, отвечают за образование таких сосудосуживающих пептидов как ангиотензин II (АПФ) и эндотелин (ЭПФ и НЭП) и инактивацию сосудорасширяющих пептидов – брадикинина и натрийуретических пептидов [1]. Для исследования АПФ и НЭП синтезировано большое количество синтетических пептидных субстратов различной длины. В то же время для ЭПФ не существует коммерчески доступных пептидных субстратов. Физиологическим субстратом для ЭПФ служит большой эндотелин (БЭТ), состоящий из 38 аминокислотных остатков, - Cys¹-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-**Trp²¹-Val²²**-Asn-Thr-Pro-Glu-His-Val-Val-Pro-Tyr-Gly-Leu-Gly-Ser-Pro-Arg-Ser³⁸. ЭПФ, расщепляя в БЭТ пептидную связь между остатками триптофана²¹ и валина²², образует эндотелин (ЭТ) с последовательностью Cys¹-Ser-Cys-Ser-Ser-Leu-Met-Asp-Lys-Glu-Cys-Val-Tyr-Phe-Cys-His-Leu-Asp-Ile-Ile-**Trp²¹** [2]. НЭП также может гидролизовать БЭТ с образованием ЭТ, который далее очень быстро расщепляется НЭП и, следовательно, НЭП не может иметь такого физиологического значения как ЭПФ [3]. При использовании БЭТ в качестве субстрата в биохимических исследованиях количество образующихся в результате ферментативного гидролиза фрагментов определяют иммунологически или с помощью ВЭЖХ [4]. Дефицитность и высокая цена БЭТ затрудняет применение его в рутинных исследованиях ЭПФ. В течение последнего десятилетия предпринимались попытки использовать для определения активности ЭПФ и другие, в том числе более короткие, чем БЭТ, синтетические пептиды, например, такие как

* - адресат для переписки

укороченный 13-членный фрагмент БЭТ с флуорогенной группой [5, 6]; 19-35 фрагмент БЭТ, у которого вместо остатка триптофана²¹ введена флуоресцирующая аминокислота пиренилаланин, а в положение 22 – 4-нитрофенилаланин, а также 10-членный пептид с другим набором аминокислот в N-концевой части, содержащий пиренилаланин в третьем положении с N-конца и 4-нитрофенилаланин в С-концевой части [7]. ЭПФ гидролизует оба последних пептида, расщепляя связь между пиренилаланином и С-концевым фрагментом. Недавно в качестве субстрата ЭПФ был использован 7-членный фрагмент БЭТ с последовательностью 3-9 [8]. Было также показано, что ЭПФ гидролизует 9-ти членный физиологический пептид брадикинин - Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg с отщеплением С-концевого дипептида Phe-Arg [9]. Таким образом, ЭПФ гидролизует как длинные, так и сравнительно короткие (7-9 аминокислотных остатков) пептиды, предпочтительно расщепляя связь, образованную карбоксильной группой гидрофобной аминокислоты.

Для проведения ряда исследований ЭПФ, включая поиск новых ингибиторов этого фермента, возникла необходимость создания небольшого и доступного субстрата, с хорошей растворимостью в буферных растворах, который позволял бы определять активность фермента в большом количестве проб с минимальными затратами времени. В настоящем исследовании синтезирован гексапептид Boc-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe(NO₂)-Arg-OH и его флуорогенный аналог СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe(NO₂)-Arg-OH (СМС – 4-карбоксиметил-7-гидроксикумарин, 7-гидроксикумарил-4-уксусная кислота), который был испытан в качестве субстрата ЭПФ из клеток эндотелия.

МЕТОДИКА. *Синтез субстрата эндотелин-превращающего фермента.*

Гексапептид Boc-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe(NO₂)-Arg-OH синтезировали конденсацией пентафторфенилового эфира трипептида Boc-Ala-Gly-Gly-OH с трипептидом Trp-Phe(NO₂)-Arg-OH. Трипептиды Boc-Ala-Gly-Gly-OH и Boc-Trp-Phe(NO₂)-Arg-OH синтезированы методом активированных эфиров с пентафторфенолом. Вос-пептиды деблокировали раствором хлористого водорода в уксусной кислоте. Деблокированный гексапептид Ala-Gly-Gly-Trp-Phe(NO₂)-Arg-OH ацилировали норборнендикарбоксимидным эфиром 7-оксикумарин-4-уксусной кислоты (СМС-эфир) и после очистки получали целевой продукт СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe(NO₂)-Arg-OH в виде хроматографически гомогенного кристаллического вещества.

Тетрапептид СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-OH, N-концевой фрагмент ферментативного гидролиза субстрата, синтезировали аналогично. Конденсацией Boc-Ala-Gly-Gly-OH с H-Trp-OCH₃ (DCC – пентафторфенол) получали защищенный тетрапептид, который деблокировали раствором хлористого водорода в уксусной кислоте. Деблокированный эфир тетрапептида ацилировали норборнендикарбоксимидным эфиром 7-оксикумарин-4-уксусной кислоты и эфирную группу удаляли омылением, после очистки получали хроматографически чистый тетрапептид СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-OH.

Получение мембранной фракции клеток эндотелия.

В качестве источника ЭПФ использовали эндотелиальные клетки пупочной вены человека 1-го пассажа, предоставленные Российским кардиологическим научно-производственным центром. Клетки трижды отмывали охлажденным (+4°C) фосфатным буфером (50 mM, pH 7,0, содержащим 150 mM NaCl) и осаждали центрифугированием в течение 2-х минут при 800 g. Клетки разрушали 3-х кратным замораживанием до -20°C и оттаиванием в 20 mM Трис-HCl буфере pH 7,0, содержащем 5 mM MgCl₂, 0,1 mM фенилметилсульфонил-фторид (PMSF), 20 мкМ пепстатина А и 20 мкМ лейпептина. Мембранную фракцию получали центрифугированием при 100000 g в течение 1 часа. Осадок суспендировали в 50 mM трис-HCl буфере pH 7,0, содержащем 0,5% тритон X-100, 150 mM NaCl и 0,1 mM ZnCl₂ (из расчета: 100 мкл буфера на осадок из 10 млн. клеток) и оставляли при комнатной температуре на 60 минут. Полученный препарат хранили при -20°C.

Определение ферментативной активности.

а) Гидролиз БЭТ. Гидролиз БЭТ проводили в 50 мМ трис-НСl буфере pH 7,0, содержащем 150 мМ NaCl и 0,1 мМ ZnCl₂ в течение 18-20 часов при 37°C [10]. Инкубационная проба (50 мкл) содержала БЭТ (8-10 мкМ) и мембранную фракцию (5-10 мкл). Параллельно проводили гидролиз БЭТ в присутствии ингибиторов – тиорфана (10⁻⁶ М) и лизиноприла (10⁻⁵ М). Продукты протеолиза БЭТ определяли с помощью ВЭЖХ на хроматографе (Beckman-Altex, model 421), используя колонку TSK-ODS-120E (4,6 мм × 25 см). Образец вводили в объёме 20-50 мкл. Элюцию проводили со скоростью 1 мл/мин, градиент создавали буферами А (20% ацетонитрил в 0,1% ТФУ) и Б (60% ацетонитрил в 0,1% ТФУ) в течение 20 минут. Регистрацию пептидов проводили при 206 нм. Местоположение пиков определяли по времени удержания на колонке, % выхода продуктов рассчитывали по площади пиков. Разделение БЭТ и ЭТ представлено на рисунке 1.

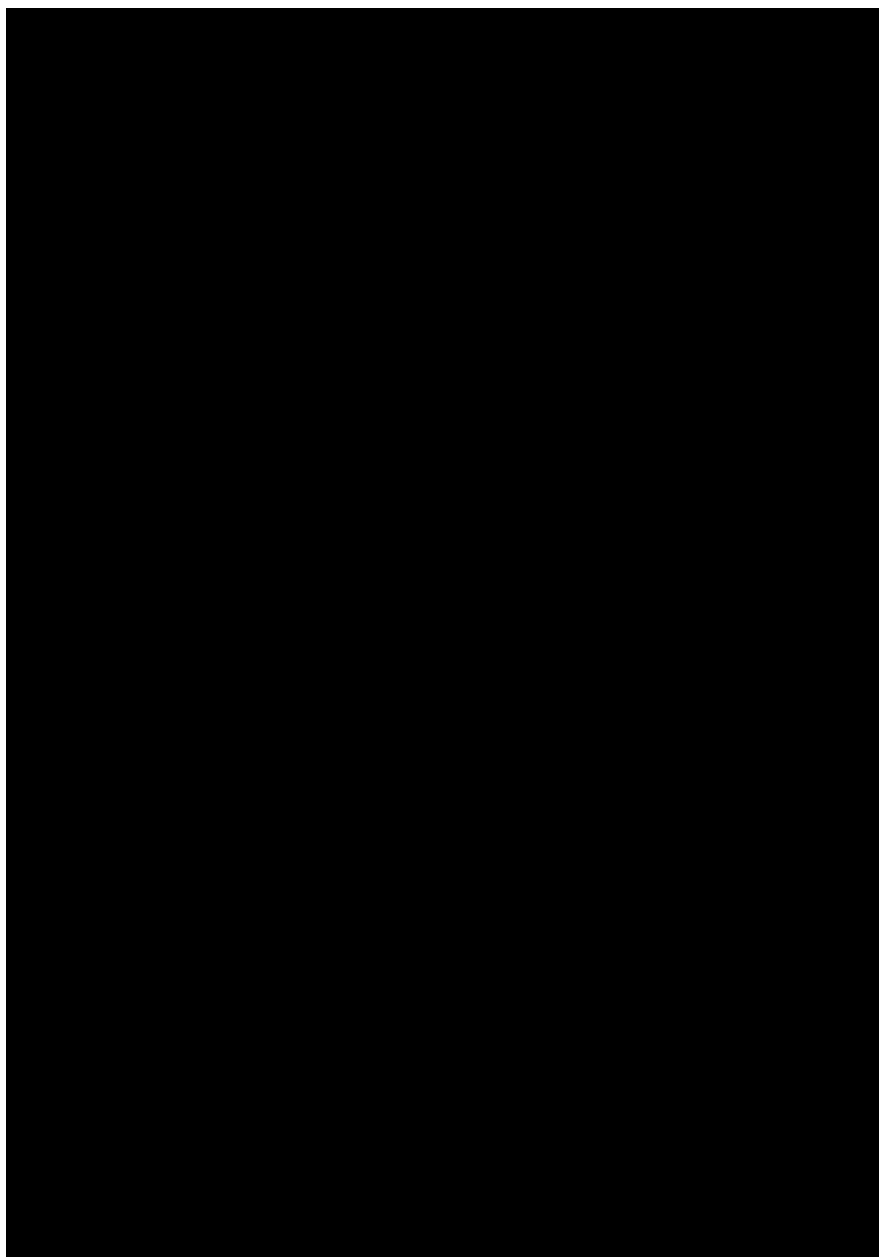


Рисунок 1.

Контроли БЭТ и ЭТ.

Хроматограмма большого эндотелина (а) и эндотелина (б). Концентрация пептидов была 2 нМ.

б) Гидролиз СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg и СМС-Ala-Gly-Gly-Trp.

1. Гидролиз пептидов мембранной фракцией. Гидролиз пептидов (5×10^{-3} М) проводили в 50 мМ Трис-НСl буфере рН 7,0, содержащем 150 мМ NaCl и 0,1 мМ $ZnCl_2$. Каждая инкубационная проба имела объем 30 мкл и содержала 10 мкл мембранной фракции. Пробы инкубировали в течение 18-20 часов при 37°C. Параллельно исследовали гидролиз пептидов в присутствии ингибитора АПФ лизиноприла (10^{-5} М). Продукты гидролиза определяли с помощью ВЭЖХ на хроматографе (Милихром А-02), используя колонку ODS-C 18 (2,0×75 мм). Образец вносили в объеме 2-5 мкл. Градиент создавали буферами А (10% ацетонитрил в 0,1% ТФУ) и Б (90% ацетонитрил в 0,1% ТФУ) в течение 10,5 минут. Регистрацию пептидов проводили при 220 нм и 280 нм. Местоположение пиков определяли по времени удержания на колонке.

2. Гидролиз пептидов ангиотензин превращающим ферментом. Гидролиз пептидов (5×10^{-3} М) проводили в 50 мМ меклиналовом буфере рН 7,4, содержащем 200 мМ NaCl. Каждая инкубационная проба имела объем 40 мкл и содержала 1 мкл раствора АПФ (0,05 мкг), очищенного из ткани почек быка [11]. Пробы инкубировали в течение 18-20 часов при 37°C, т.е. в условиях, аналогичным гидролизу БЭТ и обеспечивающих полноту гидролиза пептидов. Параллельно исследовали гидролиз пептидов в присутствии ингибитора АПФ лизиноприла (10^{-5} М). Продукты гидролиза субстратов определяли, как описано в предыдущем разделе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. При конструировании субстрата ЭПФ были приняты во внимание следующие соображения, вытекающие из литературных данных. 1. гидролизуемая ферментом связь образована карбоксильной группой гидрофобной аминокислоты, например, триптофана. 2. С-концевой фрагмент субстрата должен быть небольшим и обеспечивать хорошую растворимость субстрата в буферных растворах, (аналогично брадикинину). 3. последовательность аминокислот N-концевого фрагмента существенного влияния на гидролизуемость субстрата не оказывает. Исходя из этого мы предположили, что подходящей аминокислотной последовательностью для субстрата ЭПФ может быть, например, такая: Fl-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe(NO₂)-Arg-OH, где Fl – флуорогенная группа. Синтез пептида с такой последовательностью сравнительно несложен; благодаря остатку аргинина, он будет обладать достаточной растворимостью в инкубационном буфере и определение активности фермента с таким субстратом можно проводить флуориметрически.

Таким образом, первым этапом работы стал синтез гексапептида – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg, предположительно являющегося субстратом ЭПФ. Для экспериментального подтверждения способности этого пептида гидролизаться при участии ЭПФ, нужно было решить две взаимосвязанные задачи: 1) подтвердить наличие ЭПФ-активности в выбранной нами в качестве его источника мембранной фракции эндотелия с помощью хорошо изученного субстрата ЭПФ – БЭТ; 2) исследовать гидролиз мембранной фракцией (в случае обнаружения в ней БЭТ-конвертирующей активности) СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg. Однако в мембранной фракции кроме ЭПФ содержатся и другие мембранносвязанные металлопептидазы (например, АПФ и НЭП). Поэтому вычленение активности ЭПФ проводили с помощью специфических ингибиторов этих ферментов (лизиноприла и тирорфана).

Гидролиз БЭТ. На рисунке 2 представлена хроматограмма продуктов протеолиза БЭТ. Следует отметить, что для обеспечения полноты гидролиза субстрата реакцию проводили в течение 18-20 часов. Подобные условия проведения гидролиза БЭТ (время гидролиза и фермент/субстратное соотношение) были описаны при исследовании ЭПФ в эндотелиальных клетках быка [10]. Однако при использовании высокоочищенных препаратов ЭПФ концентрации БЭТ и время его гидролиза варьировали от 0,1 до 5 мкМ и от 15 до 60 минут соответственно [7, 10-13]. Как видно, препарат БЭТ элюировался в виде

одного основного пика (рис. 2а). В результате гидролиза БЭТ мембранной фракцией (рис. 2б) были обнаружены четыре пика, один из которых (пик 2) по местоположению соответствовал ЭТ. Выход БЭТ (пик 1) составлял 34%, а выход ЭТ составлял 15%, что доказывало присутствие в полученных мембранах эндотелин-превращающей активности. В тоже время были обнаружены дополнительные продукты гидролиза (пики 3 и 4). Эти данные указывали на то, что наряду с ЭПФ в гидролизе БЭТ принимают участие и другие мембранные протеиназы, например, такие как НЭП и АПФ.

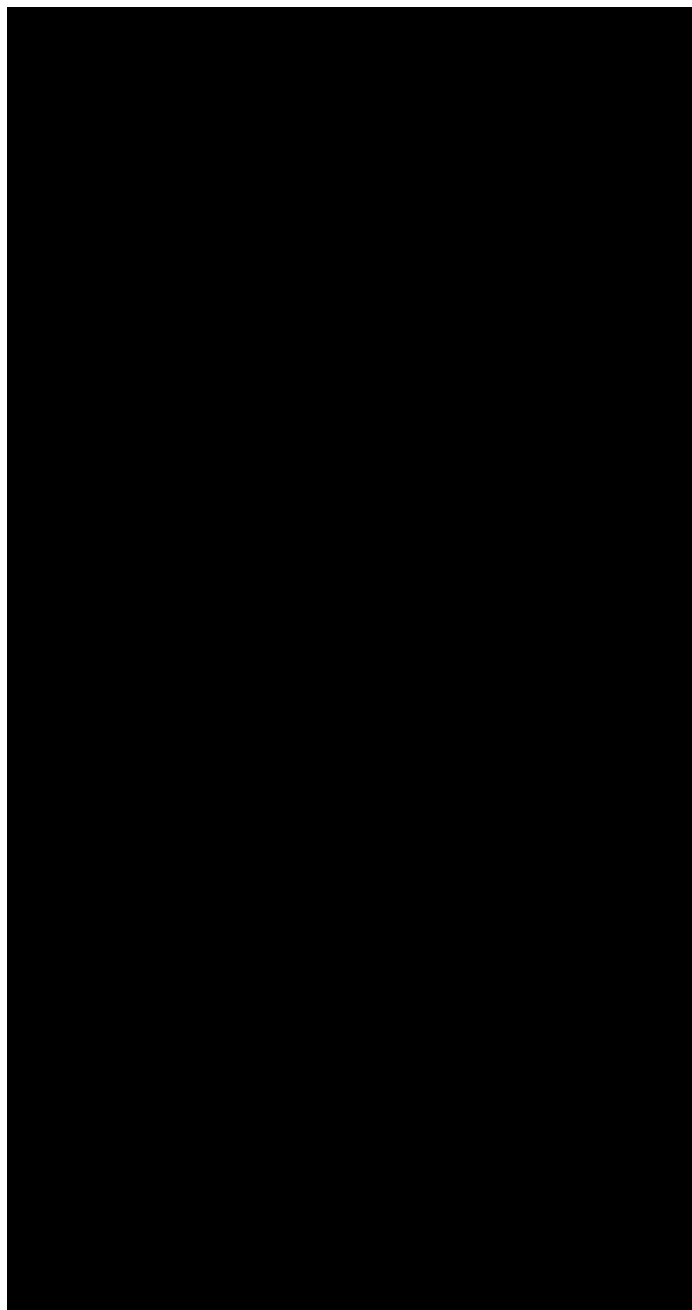


Рисунок 2.

Гидролиз БЭТ мембранной фракцией.

а. Контроль БЭТ. Пик 1-БЭТ. **б.** Хроматограмма продуктов гидролиза БЭТ. Пик 1– БЭТ, пик 2 – ЭТ, пики 3 и 4 – дополнительные продукты гидролиза. **в.** Хроматограмма продуктов гидролиза БЭТ в присутствии лизиноприла. Пик 1– БЭТ, пик 2 –ЭТ, пик 3 – дополнительный продукт гидролиза.

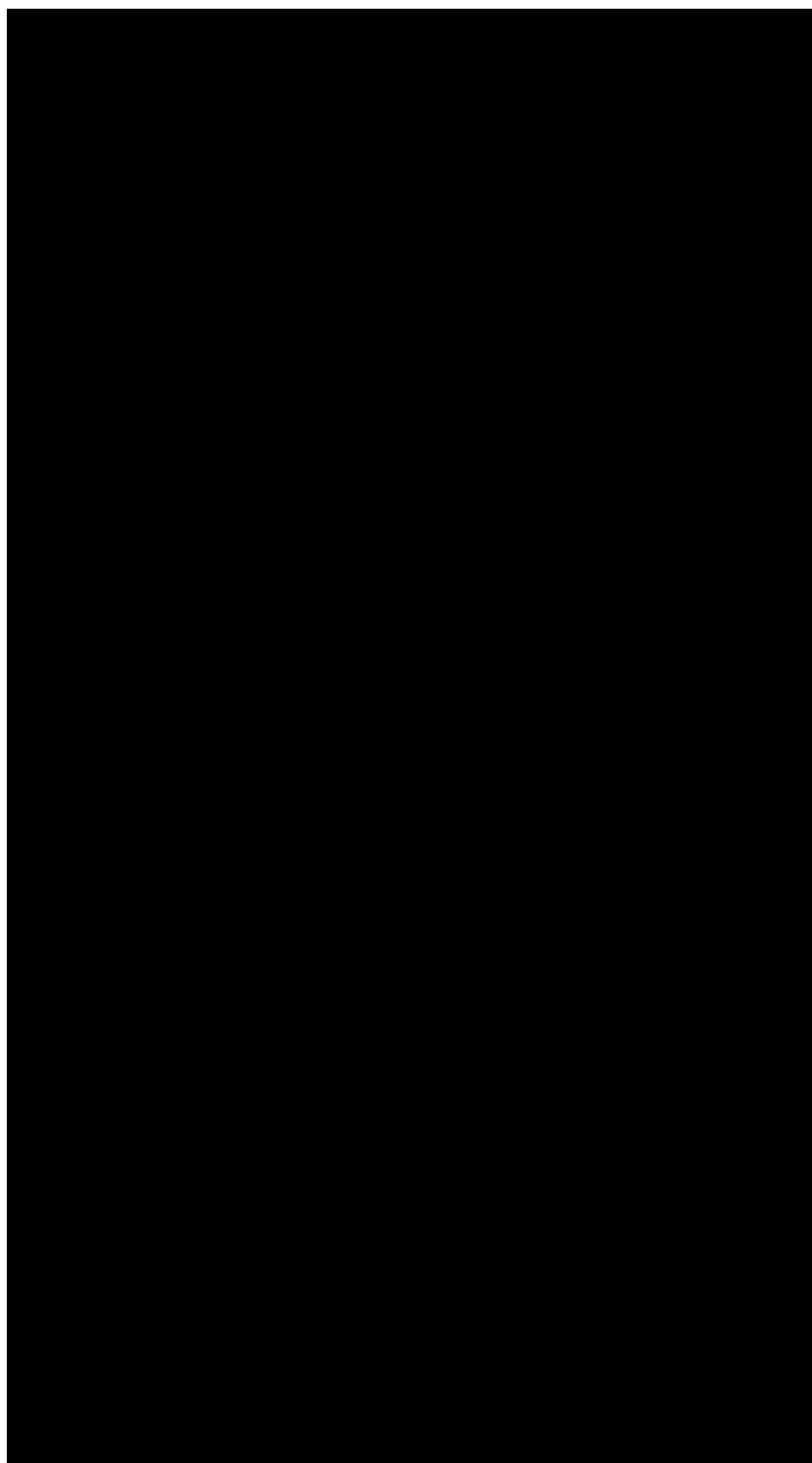


Рисунок 3.

Гидролиз СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg мембранной фракцией.

а. Контроль. Пик 1 – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg.

б. Хроматограмма продуктов гидролиза СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg.

Пик 1 – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg, пик 2 – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp, пики 3 и 4 – пептидные фрагменты.

в. Хроматограмма продуктов гидролиза СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg в присутствии лизиноприла. Пик 1 – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg, пик 2 – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp.

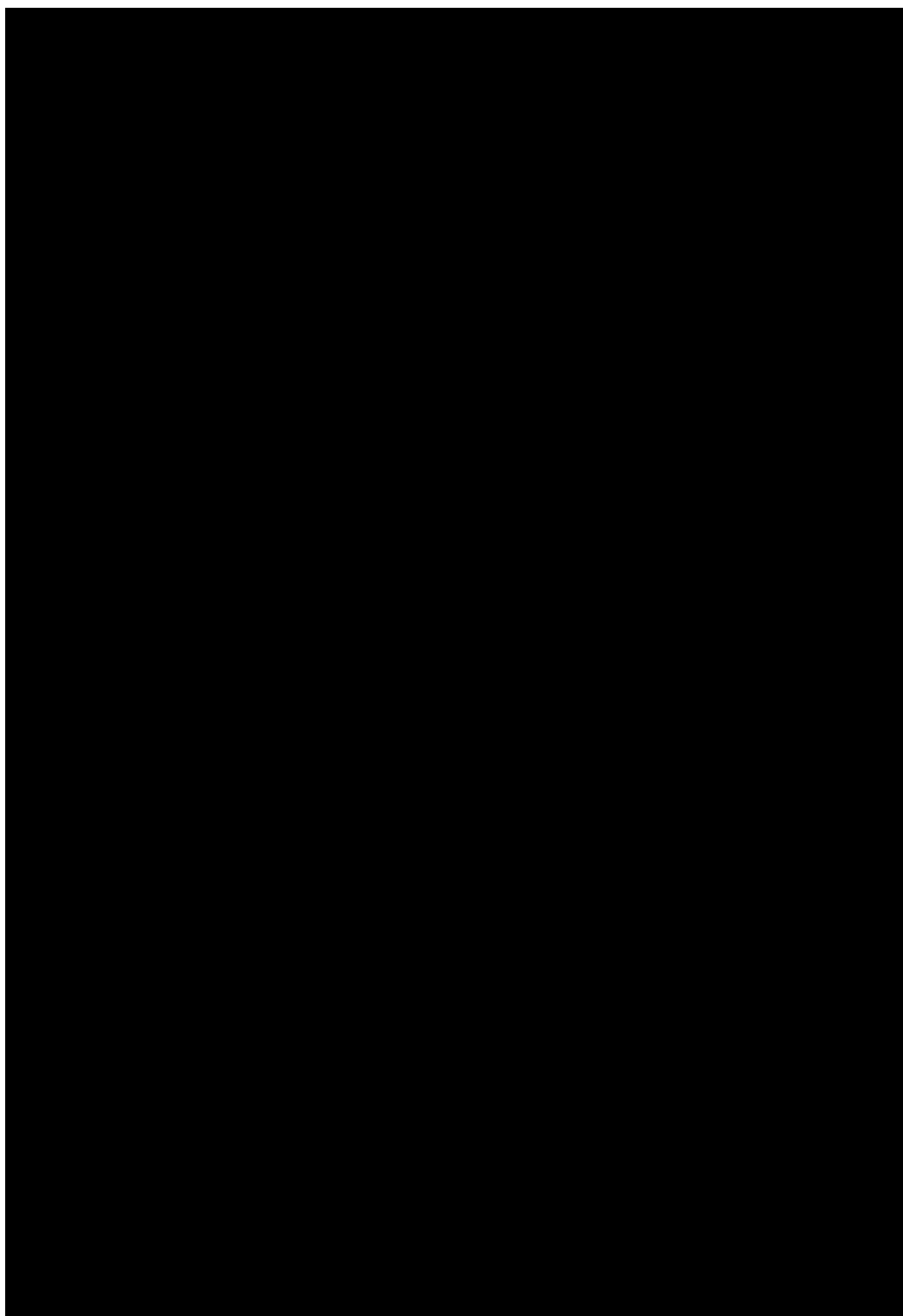


Рисунок 4.

Гидролиз СМС-Ala-Gly-Gly-Trp мембранной фракцией.

а. Контроль. Пик 1 – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp.

б. Хроматограмма продуктов гидролиза СМС-Ala-Gly-Gly-Trp. Пики 2, 3, 4 – пептидные фрагменты.

в. Хроматограмма продуктов гидролиза СМС-Ala-Gly-Gly-Trp в присутствии лизиноприла.

Пик 1 – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp.

Прямым доказательством участия этих ферментов в гидролизе БЭТ послужили данные по торможению реакции гидролиза БЭТ в присутствии тиорфана (10^{-6} М) и лизиноприла (10^{-5} М), специфичных ингибиторов указанных ферментов (рис. 2в). В этих условиях выход БЭТ составлял примерно 80%, а ЭТ – 9%, что указывало на частичное торможение гидролиза БЭТ в присутствии этих ингибиторов. Обнаружение в этих условиях ЭТ (пик 2) доказывало участие ЭПФ в гидролизе БЭТ.

Гидролиз СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg и СМС-Ala-Gly-Gly-Trp.

Как показали эксперименты с БЭТ, в его гидролизе может принимать участие не только ЭПФ, но и другие металлопептидазы, содержащиеся в мембранной фракции, такие как АПФ и НЭП. Поэтому, мы предположили, что гидролиз синтетического субстрата ЭПФ – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg препаратами мембранной фракции также, как и в случае с БЭТ, может происходить при участии ЭПФ, АПФ и НЭП. Как известно, АПФ освобождает С-концевые дипептиды, расщепляя пептидную связь, находящуюся во втором положении с карбоксильного конца олигопептидов, НЭП гидролизует связи перед гидрофобными аминокислотными остатками (Phe, Leu, Met) [14], а ЭПФ предпочтительно гидролизует связь у карбоксила гидрофобной аминокислоты [15] и также может гидролизовать брадикинин с отщеплением дипептида Phe-Arg [9]. Исходя из приведённых данных, казалось весьма вероятным, что АПФ, ЭПФ и НЭП могут расщепить связь между остатком триптофана и остатком фенилаланина с образованием дипептида Phe-Arg.

В первой серии экспериментов был исследован гидролиз мембранной фракцией СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg и его N-концевого тетрапептида – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp. Время инкубации так же, как и в случае с БЭТ, составляло 18-20 часов. В присутствии мембранной фракции СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg (3а) гидролизовался с образованием 3-х продуктов (рис. 3б), представляющих собой N-концевой тетрапептид (пик 2) и пептидные фрагменты (пики 3, 4). В присутствии лизиноприла, при блокировании АПФ (рис. 3в), наблюдалось образование только N-концевого тетрапептида (пик 2). Судя по этим данным можно было предположить, что за гидролиз N-концевого тетрапептида – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp отвечает в основном АПФ. Это предположение было подтверждено в опытах по гидролизу СМС-Ala-Gly-Gly-Trp препаратами мембранной фракции (рис. 4). После 20-часовой инкубации (рис. 4б) были обнаружены только пептидные фрагменты, идентичные полученным при гидролизе СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg (рис. 3б), а пик, соответствующий самому N-концевому тетрапептиду (рис. 4а), исчезал полностью. В присутствии же лизиноприла наблюдался очень незначительный гидролиз СМС-Ala-Gly-Gly-Trp (рис. 4в).

Для прямого подтверждения участия АПФ в гидролизе СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg была проведена вторая серия экспериментов с очищенным препаратом АПФ. Было показано, что гидролиз СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg приводит к образованию СМС-Ala-Gly-Gly-Trp и дипептидных фрагментов, элюирующихся аналогично обнаруженным при гидролизе СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg мембранной фракцией (рис. 3б). Таким образом, было установлено, что СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg – субстрат, предложенный для определения активности ЭПФ, может гидролизироваться и другими металлопептидазами, в том числе и АПФ, который принимает участие в гидролизе как СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg, так и его N-концевого тетрапептида – СМС-Ala-Gly-Gly-Trp. Следует отметить, что НЭП способен отщеплять С-концевой дипептид Phe-Arg в предлагаемой пептидной последовательности, но значительно слабее, чем АПФ [14].

Таким образом, синтезированный гексапептид - СМС-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg может применяться в качестве субстрата не только для ЭПФ, но и для АПФ и НЭП, т.е. обладает достаточно широкой специфичностью в отношении разных металлопротеиназ. Для определения активности этих ферментов необходимо использовать их специфические ингибиторы. Полученный субстрат также может быть пригодным для разработки более простого экономичного флуориметрического метода тестирования указанных ферментов в биологических образцах.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Erdos E.G., Skidgel R.A.* (1989) *FASEB J.*, **3**, 145-151.
2. *Turner A.J., Murphy L.J.* (1996) *Biochem. Pharmacol.*, **51**, 91-102.
3. *Murphy L.J., Corder R., Mallet A.I., Turner A.J.* (1994) *Brit. J. Pharmacol.*, **113**, 137-142.
4. *Akihito Moritaa, Motoyoshi Nomizrub, Misako Okitsu, Kenji Horiea, Hidehiko Yokogoshi, Peter P.* (1994) *FEBS Lett.*, **353**, 84-88.
5. *Geldern T.W., Holleman W.H., Opgenorth T.J.* (1991) *Peptide Res.*, **4**(1), 32-35.
6. *Handa B.K., Keech E.* (1992) *Int. J. Pept. Protein. Res.*, **40**(1), 66-71.
7. *Luciani N., Rocouigny H., Turcaud A., Roques B.P.* (2001) *Biochem. J.*, **356**, 813-819.
8. *Letorneau M., Roby P., Tremblay F., Carette J., Fournier A.* (2000) *J. Coronovasc. Pharmacol.*, **3615**, 28-29
9. *Mien V., Hoang M.V., Turner A.J.* (1997) *Biochem. J.*, **327**, 23-26
10. *Ohnaka K., Takayanagi R., Jamauchi T., Okazaki H., Ohashi M., Navata H.* (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **168**, 1128-1136.
11. *Елисеева Ю.Е., Павлихина Л.В., Орехович В.Н.* (1974) *Докл. АН СССР*, **217**, 953-956.
12. *Korth P., Egidy G., Parnot C., LeMoullec J-M., Corvol P., Pinet F.* (1997) *FEBS Lett.*, **417**, 365-370.
13. *Takahashi M., Matsushita Y., Iijima Y., Tanzawa K.* (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 21394-21398.
14. *Beaumont A., Fournie-Zaluski M.-C., Roquest B.P.* (1996) in: *Zinc Metalloproteases in Health and Disease*, (N.M Hooper Ed.), Taylor & Francis, London, p.p. 105-129.
15. *Turner A.J., Tanzawa K.* (1996) in: *Zinc Metalloproteases in Health and Disease*, (N.M. Hooper Ed.), Taylor & Francis, London, 1996, pp. 311-331.

Поступила: 14. 07. 2006.

STUDY OF SUBSTRATE SPECIFICITY OF A NEW PEPTIDE SUBSTRATE OF ENDOTHELIN CONVERTING ENZYME

T.A. Gureeva, E.V. Kugaevskaya, V.F. Pozdnev, V.N. Prozorovskiy, Yu.E. Elisseeva, N.I. Solovyeva

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119992 Russia; tel. (095)2465072, e-mail: Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

The new fluorogenic hexapeptide substrate CMC-Ala-Gly-Gly-Trp-Phe-Arg was used as substrate for endothelin-converting enzyme (ECE), angiotensin-converting enzyme (ACE) and neutral endopeptidase (NEP). The specific inhibitors lisinopril (ACE) and thiorphan (NEP) were used for identification of these enzyme activities.

Key words: CMC hexapeptide, endothelin-converting enzyme, angiotensin-converting enzyme, neutral endopeptidase, inhibitors.