ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ПЕДАГОГИЧЕСКИЙ

УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ В.Г. БЕЛИНСКОГО

На правах рукописи

Салдаев Дамир Абесович

**АКТИВНОСТЬ ОСНОВНЫХ КАРБОКСИПЕПТИДАЗ В ТКАНЯХ МЫШЕЙ ПРИ ВВЕДЕНИИ ТЕСТОСТЕРОНА И ПРОГЕСТЕРОНА**

03.00.04 - Биохимия

Диссертация на соискание

ученой степени кандидата

биологических наук

Научные руководители:

кандидат биологических наук

профессор Генгин М.Т.,

кандидат биологических наук доцент Вернигора А.Н.

ПЕНЗА – 2000

**содержание**

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**ВВЕДЕНИЕ**

**ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

**1.1. Нейропептиды и их обмен**

**1.2. Физико-химические свойства, субстратная специфичность и биологическая роль карбоксипептидазо-В-подобных ферментов**

**1.2.1. Карбоксипептидаза Н**

**1.2.2. ФМСФ-ингибируемая карбоксипептидаза**

**1.3. Половые стероидные гормоны**

**1.3.1. Тестостерон**

**1.3.2. Прогестерон**

**ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**2.1. Материал исследования**

**2.2. Методы исследования**

**2.2.1. Метод введения половых стероидных гормонов**

**2.2.1. Метод определения активности карбоксипептидазы Н**

**2.2.2. Метод определения активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы**

**2.2.3. Метод определения концентрации белка**

**2.2.4. Статистическая обработка результатов исследования**

**ГЛАВА 3. Результаты исследования**

**3.1. Тканевое распределение активности основных карбоксипептидаз у самцов и самок мышей**

**3.1.1. Распределение активности карбоксипептидазы Н в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадной системе самцов и самок мышей**

**3.1.2. Распределение активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы в в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадной системе самцов и самок мышей**

**3.2. Активность основных карбоксипептидаз у самок мышей при введении тестостерона и прогестерона**

**3.2.1. Активность карбоксипетидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы при введении тестостерона в тканях самок мышей**

**3.2.2. Активность карбоксипетидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы при введении прогестерона в тканях самок мышей**

**3.3. Активность основных карбоксипептидаз у самцов мышей при введении тестостерона и прогестерона**

**3.3.1. Активность карбоксипетидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы при введении тестостерона в тканях самцов мышей**

**3.3.2. Активность карбоксипетидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы при введении прогестерона в тканях самцов мышей**

**3.4. Активность карбоксипетидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы in vitro при действии тестостерона и прогестерона**

**ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**ВЫВОДЫ**

**ЛИТЕРАТУРА**

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АПМЯК – аминопропилмеркаптоянтарная кислота

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГОМК – гамма-оксимасляная кислота

ГГГС – гипоталамо-гипофизарно-гонадная система

ГГНГС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадная система

ГГНС – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

ГнРФ – гонадотропин-рилизинг-фактор

ГПЯК – гуанидинопропилянтарная кислота

ГЭМЯК – гуанидиноэтилмеркаптоянтарная кислота

ДГТ – дигидротестостерон

КП – карбоксипептидаза

КП M – карбоксипептидаза M

КП N – карбоксипептидаза N

КП U – карбоксипептидаза U

КП В – карбоксипептидаза В

КП Н – карбоксипептидаза Н

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ПСА – простатический специфический антиген

ТРФ – тиреотропин-рилизинг-фактор

ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид

ФМСФ-ингибируемая КП – фенилметилсульфонилфторид-ингибируемая карбоксипептидаза

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ЭДТА – этилдиаминтетраацетат натрия

**ВВЕДЕНИЕ**

Половое развитие и дифференциация, а также процессы, связанные с размножением, представляют собой наиболее интересные проблемы современной биологии. Важную роль в этих процессах играют половые стероидные гормоны [23, 24, 27, 37, 39, 42, 43]. Синтез и секреция половых стероидов регулируется пептидными гормонами гипоталамуса (гонадотропин-рилизинг-фактор) и гипофиза (лютеинизирующий гормон и фолликулостимулирующий гормон) [24, 27, 37, 39, 42]. Кроме того, в регуляцию уровня половых стероидных гормонов вовлекаются многие нейропептиды, которые обычно не связывают с половой системой. Например, β-эндорфин [277], энкефалины [61], АКТГ [277], Arg8-вазопрессин [175, 214, 266], Arg8-вазотоцин [214] и др. Нейропептиды синтезируются в виде высокомолекулярных неактивных предшественников, в структуре которых аминокислотные последовательности активных пептидов ограничены парами остатков основных аминокислот [1, 65, 113, 120, 147]. Для высвобождения активных пептидов необходимо последовательное действие трипсиноподобного и карбоксипептидазо-В-подобного ферментов [113, 120, 152, 170]. К карбоксипептидазо-В-подобным относятся ферменты, отщепляющие остатки основных аминокислот с карбоксильного конца белка-предшественника. Именно эти ферменты участвуют на конечных стадиях процессинга и, вероятно, играют определенную роль в регуляции уровня активных пептидов [43, 120, 152, 170]. Известно, что карбоксипептидаза Н (КП Н, КФ 3.4.17.10) участвует в биосинтезе многих нейропептидов, таких как инсулин [6, 133, 253], глюкагон [46], энкефалины [46, 49], АКТГ [54], вазопрессин [57], окситоцин [58], вещество P [59], атриальный натрийуретический фактор [38]. Поскольку многие из этих пептидов принимают участие в регуляции уровня половых стероидных гормонов [24, 27, 39, 42], то возможно, что КП Н вовлекается в процессы половой дифференцировки и размножения, однако ее роль в этих процессах до конца не ясна. Вместе с тем предполагают, что функции недавно обнаруженной ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы (ФМСФ-ингибируемой КП) сходны с таковыми КП Н. Однако роль этого фермента, практически, не изучена.

Целью данной работы было изучение активности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадной системе самцов и самок мышей при введении тестостерона и прогестерона. При выполнении работы были поставлены следующие задачи. 1. Сравнить распределение активности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП в отделах ГГНГС самцов и самок. 2. Изучить активность исследуемых карбоксипептидаз в динамике у самок при введении разных доз тестостерона и прогестерона. 3. Сравнить активность КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП у самцов и самок при введении тестостерона и прогестерона. 4. Изучить активность исследуемых ферментов in vitro при действии тестостерона и прогестерона.

Научная новизна и практическая ценность работы. Впервые изучено влияние тестостерона и прогестерона на активность КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП в ГГНГС самцов и самок мышей. Установлена зависимость изменения активности исследуемых ферментов от пола животного и времени после введения стероидных гормонов. Полученные результаты представляют интерес для более глубокого понимания механизмов функционирования пептидергических систем и роли основных карбоксипептидаз в процессах, связанных с половыми стероидными гормонами.

Апробация и публикации. Материалы диссертации доложены на IV Пущинской конференции молодых ученых (Пущино, 1999 г.), на XXXVIII Международной студенческой конференции ”Студент и научно-технический прогресс” (Новосибирск, 2000 г.) и на итоговых научных конференциях ПГПУ (1998, 1999, 2000). По результатам исследования опубликовано 5 статей.

**ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

**1.1. Нейропептиды и их обмен**

Нейропептиды – это полифункциональные высокоактивные вещества пептидной природы, которые играют важную роль в реализации и регуляции различных физиологических и поведенческих реакций организма.

Нейропептиды играют важную роль в адаптационных процессах, проявляют анальгетические эффекты, участвуют в формировании пищедобывательного и полового поведения [26, 28, 30, 35, 140, 169, 207]. Многие из этих веществ вовлекаются в регуляцию полового созревания [2, 4, 38, 40]. Нейропептиды влияют на половую дифференциацию организма (ГнРФ, ЛГ, ФСГ, пролактин [24, 27, 39, 42, 43]), на процессы внимания и памяти (например, АКТГ и α-меланотропин - стимуляторы запоминания и внимания), на эмоциональное поведение (тиролиберин, меланостатин, кортиколиберин - стимуляторы эмоционального поведения), обладают анальгезирующим действием (нейротензин, опиодные пептиды) [34, 36].

Уровень нейропептидов определяется соотношением скоростей их синтеза и деградации.

Нейропептиды синтезируются в организме, как правило, в виде высокомолекулярных неактивных предшественников (препропептидов) [22]. В состав последних могут входить аминокислотная последовательность как одного, так и нескольких нейропептидов. Известно много белков, содержащих в своей структуре последовательности нейропептидов: предшественник гонадотропин-рилизинг-фактора, проопиомеланокортин, препроэнкефалин А, продинорфин (препроэнкефалин В) и другие [1, 32]. В частности, в состав предшественника гонадотропин-рилизинг-фактора входит ГнРФ и гонадолиберин-ассоциированный пептид.

Все препропептиды содержат на N-конце сигнальную последовательность из 15-20 остатков гидрофобных аминокислот. Нейропептиды, входящие в состав предшественника, как правило, ограничены с C- и N-концов (фланкированы) парами остатков основных аминокислот – аргинина и лизина [1, 3, 65, 81, 113, 120, 147].

Сигнальная последовательность, взаимодействуя с рецепторами эндоплазматического ретикулума, способствует переносу предшественника нейропептида в просвет ретикулума. В цистернах эндоплазматического ретикулума под действием сигнальной пептидазы происходит отщепление сигнальной последовательности, а также N-гликозилирование и формирование характерной для полипептида третичной структуры, которая препятствует обратному выходу белка в цитоплазму. Посттрансляционная модификация, включающая гликозилирование, амидирование, ацетилирование или сульфирование, предотвращает нарушение процессинга и образование нетипичных пептидов [1, 19].

Предшественники нейропептидов синтезируются на рибосомах гранулярного эндоплазматического ретикулума. Как сказано выше, препропептиды не обладают функциональной активностью. Для получения активных форм, они подвергаются посттрансляционному процессингу, одним из основных механизмов которого является ограниченный протеолиз [3, 5, 20, 21].

Процессинг биологически активных пептидов осуществляется при передвижении молекул пропептидов по гранулярному эндоплазматическому ретикулуму, комплексу Гольджи и в секреторных везикулах [123]. Секреторные везикулы содержат полный набор ферментов, необходимых для процессинга и специальные системы поддержания pH внутри везикул [22].

Процессинг нейропептидов внутри секреторных везикул включает в себя эндо- и экзопротеолитические реакции. Эндопротеолиз осуществляется при действии трипсиноподобных протеиназ (проопиомеланокортин-превращающего фермента [176, 177], продинорфин-превращающего фермента [95, 130], тиоловой прогормонконвертазы [57, 58], субтилизиновых эндопептидаз фурина, PC1, PC2, PC3 и PC4 [238]). В результате происходит расщепление пропептидов по парам остатков основных аминокислот [22, 258]. Продукт, образовавшийся после действия эндопептидаз, далее подвергается экзопротеолизу с участием аминопептидазо-В- и/или карбоксипептидазо-В-подобных ферментов. В результате происходит удаление ”лишних” N- и/или С-концевых остатков основных аминокислот.

Известно, что в различных тканях из одного белкового предшественника образуются различные нейропептиды [1, 32]. Так из проопиомеланокортина в аденогипофизе образуются преимущественно АКТГ, β-липотропин и β-эндорфин. В промежуточной доле гипофиза они подвергаются дальнейшему расщеплению с образованием α-меланоцитстимулирующего гормона и фрагментов β-эндорфина [1]. Тканевая специфичность, по-видимому, может быть связана с различным набором ферментов в разных тканях и/или с различными способами регуляции их активности. Поэтому представляет интерес изучение ферментов процессинга со сходной (но не идентичной) субстратной специфичностью. Такие исследования интересны не только для выяснения вопросов, связанных с функционированием данных энзимов, но и для понимания механизмов образования различных нейропептидов из одних и тех же предшественников в разных тканях. Поскольку карбоксипептидазо-В-подобные ферменты, то есть отщепляющие остатки основных аминокислот (аргинина и лизина) с карбоксильного конца пептидов, участвуют в конечной стадии процессинга биологически активных пептидов, то их изучение представляет особый интерес.

**1.2. Физико-химические свойства, субстратная специфичность и биологическая роль карбоксипептидазо-В-подобных ферментов**

К настоящему времени в тканях человека и животных обнаружен ряд таких ферментов: КП B (КФ 3.4.17.2), КП N (КФ 3.4.17.3), КП M (КФ 3.4.17.12), КП U, КП H (КФ 3.4.17.10), ФМСФ-ингибируемая КП и др.

КП B, КП N, КП M, КП U и КП Н отщепляют аргинин и лизин с С-конца пептидов [50, 76, 91, 102, 104, 120, 122, 141, 142, 143, 227, 247]. КП B способнa также (но с меньшим сродством) отщеплять остатки ароматических аминокислот [50]. Все вышеперечисленные карбоксипептидазы, кроме КП U и КП Н, обладают и эстеразной активностью [50, 76, 91, 102, 104, 120, 122, 141, 142, 143, 144, 227, 247]. Причем у КП N и КП M она намного превышает пептидазную [91, 102, 104, 143, 227, 247].

КП Н имеет кислый оптимум рН 5,5-6,0 [185, 234]. Другие карбоксипептидазы проявляют максимальную активность в нейтральной либо слабощелочной среде. В частности, оптимум рН для КП B, КП N и КП M равны, соответственно, 7,0-9,0; 7,6 и 7,0 [50, 91, 102, 212, 227].

Ионы Со2+ повышают пептидазную активность КП B, КП N, КП M, КП Н [91, 143, 227, 247, 284], но снижают эстеразную активность КП B [284], а также пептидазную активность КП U [76, 142]. Ионы Cd2+ снижают активность КП B [284], КП N [143, 227], КП M [247]. Хелатирующие агенты (ЭДТА, о-фенантролин), и дикарбоновые кислоты, такие как ГПЯК, АПМЯК и ГЭМЯК, ингибируют КП В, КП N, КП M, КП Н [50, 76, 89, 91, 102, 142, 143, 144, 147, 196, 195, 212, 227, 247, 276].

Карбоксипептидазы КП B, КП N, КП M, КП U и КП H являются металлокарбоксипептидазами и содержат в своих активных центрах ионы Zn2+ [89, 108, 121, 143, 181, 262, 263].

КП В (Mr 34 кДа) [74], КП M (Mr 62 кДа) [91, 247] и КП Н [89, 181, 262] состоят из единственной полипептидной цепи. Остальные карбоксипептидазы состоят из нескольких субъединиц: КП N (Mr 280 кДа) – из четырех (двух с Mr 88 кДа, не обладающих ферментативной активностью, одной с Mr 55 кДа и одной с Mr 48 кДа) [173]; КП U – из восьми [144, 276].

Аминокислотные последовательности металлокарбоксипептидаз схожи между собой. В частности, аминокислотная последовательность активных субъединиц КП N на 43% идентична последовательности КП H, на 41% - КП M, на 29% - КП A и на 18% - КП B, аминокислотная последовательность КП M на 41% идентична КП H, на 15% - КП B и КП A [91, 246, 249].

КП B, КП N, КП M, КП U, КП H синтезируются в виде неактивных проформ, которые приобретают активность под действием трипсина или трипсиноподобных ферментов [89, 91, 92, 122, 141, 142, 181, 249].

Основные карбоксипептидазы отличаются распределением в тканях и органах.

КП B обнаружена в экзокринных клетках поджелудочной железы и в поджелудочном соке [50].

КП N присутствует в плазме крови, имеется единичная работа по обнаружению КП N в микросомах плаценты [161].

КП M широко распространена во всех органах и тканях. Наибольшая активность фермента обнаружена в человеческой плаценте, в 3-4 раза ниже - в почках, еще в 2-2,5 раза ниже - в легких [248]. В нервной ткани активность фермента на порядок ниже, чем в плаценте. Активность КП M в периферических нервах выше, чем в головном мозге [209].

Биологическая роль карбоксипептидаз разнообразна.

КП B участвует в переваривании белков пищи [212].

КП N, КП M, КП U, в отличие от КП B, способны вовлекаться в обмен различных пептидов. В частности, есть данные о том, что КП N (наряду с КП M и КП U) может вовлекаться в расщепление брадикинина [77, 91, 160, 239, 241, 247], инактивацию анафилотоксинов [69, 76, 141, 142, 229], а также (наряду с КП M) – в превращения предшественников энкефалинов [91, 247, 248]. Кроме этого, КП N способна участвовать в постсинаптической модификации креатинкиназы [270], енолазы [279]. Показано, что активность КП N изменяется при гипербрадикинизме и различных легочных заболеваниях (например, астме) [103].

Предполагают, что КП U вовлекается в процессы свертывания крови и локального воспаления при ревматоидном артрите [77].

**1.2.1. Карбоксипептидаза Н**

Карбоксипептидаза Н (КП Н, энкефалинконвертаза, карбоксипептидаза Е, КФ 3.4.17.10) впервые была выделена и охарактеризована в 1982 г. Fricker L.D. и Snyder S.H. из мозга, гипофиза и хромаффинных гранул надпочечников [120]. Она обладает, практически, абсолютной специфичностью по отношению к пептидным субстратам с С-концевыми основными аминокислотами [14, 16, 98, 275]. КП Н хорошо отщепляет остатки -Lys и -Arg от Arg8-вазопрессин-Gly-Lys-Arg, а также превращает 125I-Met-энкефалин-Arg и 125I-Met-энкефалин-Lys в 125I-Met-энкефалин [147, 152]. Фермент отщепляет остатки -Lys15-Lys16-Arg17 с карбоксильного конца фрагмента АКТГ (АКТГ1-14) и остатки -Arg с С-конца гиппурил-L-Arg и Leu-энкефалин-Arg [275]. КП Н с очень низким сродством отщепляет остаток гистидина с карбоксильного конца проокситоцина [215, 251].

Карбоксипептидаза Н является тиолзависимым металлоферментом, в активном центре которого находится Zn2+ [151, 152]. Фермент имеет оптимум рН 5,5-6,0 [98, 132, 152, 242, 281], pI 4,9 [185], ингибируется CuCl2, HgCl2, р-хлормеркурфенилсульфатом, АПМЯК, 2-меркаптометил-3-гуанидилэтилтиопропановой кислотой, ЭДТА и 1,10-фенантролином [98, 122, 147, 152]. Наиболее эффективными ингибиторами являются ГЭМЯК и ГПЯК с Ki 8,8 и 7,5, соответственно [89, 118, 234, 260]. КП Н ингибируется Met- и Leu-энкефалинами, веществом Р, вазопрессином, окситоцином, тиреотропин-рилизинг-фактором [150, 225, 235]. С окситоцином и АКТГ ингибирование проявляется уже при концентрации 2-20 мМ [150]. Ki для Met-энкефалина, Leu-энкефалина, Met-энкефалин-Arg6-Gly7-Leu8 и Met-энкефалин-Arg6-Phe7 равны, соответственно, 12,0, 6,5, 7,0 и 5,5 мМ [150]. Лизин и аргинин являются конкурентными ингибиторами КП Н. Ki для аргинина и лизина равны, соответственно, 4,6±1,3 и 7,6±1,9 [146]. Бромацетил-D-Arg, необратимый ингибитор КП В и КП N, также ингибирует и КП Н [118]. Сульфат цинка, хлорид кальция, N-этилмалеимид и ФМСФ не влияют на активность КП Н [98]. Фермент активируется ионами Co2+ в 5-10 раз, ионами Ni2+ в 2-3 раза, [89, 98, 122, 152, 234, 259, 260]. КП Н способна связывать ионы Ca2+ [211]. При повышенной температуре она дестабилизируется ионами Ca2+ и стабилизируется низкой концентрацией этиленгуанидинтетрауксусной кислотой [211]. Ионы Ca2+ не влияют на активность фермента [211]. Этиленгуанидинтетрауксусная кислота в микромолярных концентрациях активирует КП Н. В этом случае происходит изменение Vmax, а не Km [211]. Уменьшение pH и увеличение концентрации ионов Ca2+ индуцируют агрегацию данного фермента [255]. Освобождение КП Н и инсулина из изолированных клеток Лангерганса крысы ингибируется удалением ионов Ca2+ из среды [135, 136].

Таким образом, присутствие ионов Ca2+ в среде может способствовать тепловой дестабилизации КП Н, а также агрегации ее в проводящих путях комплекса Гольджи и освобождению из клетки.

Ген КП Н был клонирован и секвенирован [48, 187, 232]. Транскрипция КП Н осуществляется с единственного сайта транскрипции [250]. мРНК КП Н состоит из 2100 нуклеотидов [114].

КП Н синтезируется в виде предшественника с Mr 75 кДа, состоящем из 476 аминокислотных остатков [154, 232, 254] (у морского черта Lophius americanus – из 454 [184]). Он, предположительно, содержит сигнальный пептид. Затем проКП Н с Mr 65-75 кДа подвергается посттрансляционному С- и N-концевому [133, 149, 232]. Этот процесс идет в секреторных везикулах под действием прогормон-конвертазоподобного фермента [116, 253].

Во всех органах и тканях КП Н представлена в двух формах: растворимой и мембраносвязанной. Обе формы являются гликопротеинами, имеют сходные свойства (идентичную субстратную специфичность и чувствительность к групп-специфичным реагентам) и отличаются активностью (растворимая более активна). Mr мембранной формы 55-57 кДа, Mr растворимой формы 53-57 кДа [15, 17, 89, 98, 132, 134, 147, 153, 154, 259, 262, 281].

Следует отметить, что с повышением рН мембраносвязанная форма становится неустойчивой и переходит в растворимую. По-видимому, это связано с комбинированными полярными и гидрофобными взаимодействиями карбоксильного конца пептида [115, 134]. Имеются сведения о том, что мембранная форма кп н (57 кДа) связана с эндоплазматическим ретикулумом и элементами комплекса Гольджи, а растворимая форма кп н (54 кДа) – с секреторными гранулами [133]. Соотношение мембраносвязанной и растворимой форм КП Н в разных клетках и тканях отличается. В частности, в клетках линий RIN 1046-38 и RIN 1046-44 75% зрелой КП Н обнаружено в мембраносвязанной форме [107]. С другой стороны, в передней и задней долях гипофиза 70% всей активности КП Н представлено растворимой формой [222].

В настоящее время обнаружено несколько видов мембраносвязанной и растворимой форм фермента, отличающихся по молекулярной массе. В растворимой фракции очищенных секреторных гранул, содержащих инсулин, выявлена форма КП Н с Mr 55 кДа [89]. В передней доли гипофиза обнаружено две формы КП Н – с Mr 56 и 53 кДа, а в задней – только форма с Mr 53 кДа. Эти формы имеют сходные каталитические свойства [222, 223]. Различия в молекулярной массе мембраносвязанной и растворимой форм КП Н, по-видимому, связано с наличием у первой, так называемого ”мембранного якоря”. С-концевая область мембраносвязанной КП Н (51 аминокислотный остаток) образует амфифильную α-спираль, которая и может служить гидрофобным ”мембранным якорем” [105, 206, 271]. С другой стороны, D. Parkinson [222, 223] высказывает сомнения относительно возможности перехода мембраносвязанной формы в растворимую посредством С-концевого протеолиза.

Уровни мРНК КП Н и активности КП Н в мозге и тканях в целом коррелируют между собой [66, 114]. мРНК КП Н и ферментативная активность обнаружена в клонах эндокринных клетках – AtT-20, GH-3, GH4C1 и неэндокринных – L, 3T3, SK-HEP-1, HEK293, COS, C127 [100, 163]. Наивысшие уровни мРНК КП Н обнаружены в пирамидальных клетках гиппокампа, в передней и промежуточной долях гипофиза, эпендимных клетках боковых желудочков мозга, базолатеральной миндалине, супраоптическом и паравентрикулярном ядрах. Средние уровни мРНК КП Н у крыс обнаружены в таламусе, медиальном коленчатом ядре, коре мозжечка и промежуточной оливе. Наименьшие уровни выявлены в гранулярном клеточном слое гиппокампа, латеральном гипоталамусе, бледном шаре и в ретикулярной формации ножки мозга [183].

Высокая экспрессия мРНК КП Н отмечена в паравентрикулярном и супраоптическом ядрах гипоталамуса – местах преимущественного синтеза окситоцина и вазопрессина [72]. Обнаружено увеличение концентрации мРНК КП Н при увеличении содержания этих двух пептидов [72]. В то же время, в других зонах мозга с высоким уровнем нейропептидов не наблюдается изменений уровня мРНК КП Н при осмотической стимуляции [72].

Отделы мозга отличаются по уровню активности КП Н более чем в 10 раз. Распределение активности этой карбоксипептидазы в целом соответствует распределению нейропептидов [18, 25, 122, 182]. Максимальная активность растворимой формы фермента обнаружена в гипофизе: в передней доли – в 20 раз больше, чем в задней [122, 180, 222, 256, 262]. Далее по мере снижения активности следуют стриатум, гиппокамп, кора больших полушарий, таламус с гипоталамусом, средний мозг и мозжечок [256]. При этом в гипоталамусе высокая активность КП Н обнаружена в медиальном возвышении, супраоптическом, паравентрикулярном и супрахиазматическом ядрах [180]. Супраоптическое ядро (богатое телами нейронов) содержит, в основном, неактивную 65 кДа форму КП Н. Срединное возвышение и гипофизарная ножка – богатые аксонами области – содержат формы КП Н как с Mr 65 кДа, так и с Mr 55 кДа. Нервные окончания задней доли гипофиза содержат, в основном, форму КП Н с Mr 55 кДа [149]. В стриатуме высокое содержание имуннореактивной КП Н отмечено в стриасомах (клетках богатых веществом Р) [81, 225]. В гиппокампе КП Н обнаружена в пирамидальных клетках и во внутренней части молекулярного слоя зубчатой извилины. Фермент также обнаружен в центральных нейронах миндалины [180]. Кроме этого, активность КП Н обнаружена в сердце – правом и левом предсердиях (активность в тканях желудочков очень низкая) [181, 182]. Имеются сведения о наличии активности КП Н в водянистой жидкости глаза человека [220]. Тканевое и региональное распределение КП Н сходно у разных видов животных (например, у быка, крысы, мыши, акулы, Xenopus и Aplysia) и человека [117, 165].

В клетке КП Н локализована, в основном, в секреторных гранулах, причем часто совместно с биологически активными пептидами – инсулином [133], глюкагоном [6, 253], энкефалинами [46, 49], АКТГ [54], вазопрессином [57], окситоцином [58], веществом P [59], атриальным натрийуретическим фактором [38].

Следует отметить, что уровень мРНК КП Н способен быстро изменяться в ответ на внешние воздействия. В частности, уровень мРНК КП Н повышается в ганглионарных клетках сетчатки глаза сразу после смены условий освещенности, особенно при смене темноты на свет. Однако в это же время снижается количество самого белка КП Н. В темноте КП Н экспрессируется в фоторецепторных клетках. На свету экспрессия КП Н резко индуцируется в ганглионарных клетках сетчатки глаза, а в фоторецепторных клетках экспрессия снижается [237].

Уровень мРНК КП Н увеличивается под действием галоперидола в промежуточной и задней долях гипофиза; в клетках PC12 (клеточная линия феохромоцитомы крыс) – под влиянием фактора роста нервов [87, 131, 172, 221, 268]. Короткое (1-3 ч) воздействие 50 мМ раствора KCl стимулирует секрецию КП Н клетками РС12 без синтеза белка фермента. Пролонгированное (24-48 ч) действие раствора KCl стимулирует секрецию КП Н без изменения внутриклеточного уровня КП Н. При этом уровень мРНК КП Н не изменяется после 2-х часов воздействия, увеличивается на 35% после 5 часов и на 75% после 24-72 часов воздействия [87].

В клетках GH4C1 (из переднего гипофиза крысы, продуцирующие пролактин) 50 мМ раствор KCl увеличивает секрецию КП Н и пролактина в 10 раз, а 100 мМ тиреотропин-рилизинг фактор – в 2-3 раза [119]. Кроме того, эстрадиол (1 нМ), инсулин (300 нМ) и фактор роста эпидермиса (10 нМ) увеличивают внутриклеточный уровень КП Н в 2 раза по сравнению с контролем. Km при этом не изменяется, но увеличивается Vmax [119].

Бромкриптин вызывает снижение уровня мРНК КП Н в промежуточной доли гипофиза [221].

C. Rodriguez и соавт. обнаружили, что действие дексаметазона на клетки AtT-20 снижает уровень мРНК КП Н и мРНК проопиомеланокортина примерно на 30% [232]. С другой стороны, прибавление кортикотропин-рилизинг фактора к клеткам, которые подвергались воздействию дексаметазона, вызывает 2-3-х кратное увеличение уровня мРНК КП Н и мРНК проопиомеланокортина [232]. Авторы считают, что уровни мРНК проопиомеланокортина и мРНК КП Н согласованно регулируются кортикотропин-рилизинг фактором и стероидными гормонами. При действии кортикотропин-рилизинг фактора на клетки AtT-20, не подверженные действию дексаметазона, происходит возрастание активности КП Н [186].

При хроническом прибавлении дексаметазона, кортикостерона, кортикотропин-рилизинг фактора, соматостатина к клеткам линии AtT-20/D16v уровень мРНК КП Н и активность КП Н не изменяются [186, 265].

При внутрибрюшинном введении дексаметазон и гидрокортизон (в дозах 1 и 100 мг на кг массы тела, соответственно) снижают активность растворимой и мембраносвязанной формы КП Н в гипофизе, гипоталамусе и стриатуме крыс, но динамика влияния во времени отличается [10]. В изученные интервалы (0,5, 4 и 24 часа после инъекции) дексаметазон сильнее подавляет активность в начальный период, тогда как действие гидрокортизона более выраженно через 24 часа после введения. In vitro дексаметазон и гидрокортизон не оказывают влияния на активность КП Н [10]. Авторы предполагают, что снижение активности КП Н in vivo происходит за счет снижения синтеза мРНК КП Н.

Smith D.R. и соавт. [250] предполагают, что экспрессия гена КП Н регулируется тиреоидными гормонами. В частности, они установили, что экспрессия гена КП Н в переднем гипофизе крыс стимулируется при системном недостатке тиреоидных гормонов.

С возрастом у самцов крыс активность КП Н изменяется следующим образом. У эмбрионов мРНК КП Н экспрессируется как в нервной (таламус, гипоталамус, средний и продолговатый мозг, кортикальная пластинка и спинной мозг, а также периферические ганглии), так и в других тканях (сердце и первичные хрящи) [283]. В постнатальном периоде практически во всех отделах мозга, в частности в гипофизе и гипоталамусе, а также в надпочечниках, активность данного фермента повышалась со дня новорожденности до 30-го дня постнатального периода. У 90-дневных самцов отмечено некоторое снижение активности КП Н. Наибольшая активность исследуемого фермента обнаружена у 120-дневных крыс. В семенниках активность КП Н снижалась в период со дня новорожденности до 10-го дня, затем повышалась до максимального уровня к 30-му дню постнатального периода. Далее вплоть до 120-дневного возраста, активность этого фермента практически не изменялась [12, 85].

Таким образом, в большинстве органов (за исключением семенников) обнаружено повышение активность КП Н с минимального уровня у новорожденных до максимального у 120-дневных крыс.

Следует отметить, что в постнатальном развитии (вплоть до половозрелого состояния) увеличивается содержание ряда нейропептидов [62], при этом зрелые формы нейропептидов преобладают над их предшественниками [197]. Все это позоляет сделать предположение о наличии связи между изменениями активности КП Н и уровня нейропептидов в онтогенезе.

Имеются также данные о половых отличиях в активности КП Н [44]. Наибольшие различия (в частности, в гипоталамусе) отмечены непосредственно в период полового созревания. Начиная с 90-дневного возраста, достоверные половые различия в активности данного фермента обнаружены лишь в почках и половых железах. Особенно это выражено у 120-дневных крыс.

Таким образом, в период полового созревания различия в уровне активности КП Н между самцами и самками отмечены практически во всех органах (гипофиз, гипоталамус и половые железы), отвечающих за половую дифференцировку организма. В то же время, у половозрелых животных (120-дневных) различия сохраняются лишь в гонадах.

Имеются сведения о том, что инъекции увеличивающихся доз ГЭМЯК в желудочки мозга приводят к дозозависимому снижению уровня Met- и Leu-энкефалинов в гипоталамусе крыс. При этом отсутствовали измененения в содержании β-эндорфина и динорфина1-17. Введение ГЭМЯК увеличивало содержание лютеинизирующиего гормона (ЛГ) и гонадотропин-рилизинг-фактора (ГнРФ) на 75% и снижало уровень пролактина в плазме крови на 60% [71].

Обнаружено, что синдром ожирения связан с мутацией в гене, кодирующем КП Н (единичная точечная мутация Ser202 на Pro). Она уменьшает эффективность процессинга прогастрина, при этом наблюдается повышение синтеза прогастрина и сохранение почти нормальной продукции биологически активных гастринов [170, 269]. Кроме того, эта мутация у мышей линии fat/fat приводит к нарушениям процессинга проинсулина (и нарушению внутриклеточного фолдинга КП Н) [83, 158, 159, 210, 272, 273]. У мышей мембраносвязанная КП Н выступает в роли сортирующего рецептора – специфически связывает белки, проходящие через регулируемый секреторный путь. В частности, КП Н секреторных гранул гипофиза быка, связывает проинсулин, проэнкефалин и N-проопиомеланокортин1-26 со сходной кинетикой [83]. Это связывание происходит с низким сродством и является ионозависимым [83]. При дефиците КП Н гормоны гипофиза секретируются через нерегулируемый секреторный путь. В частности, происходит неправильный внутриклеточный транспорт проопиомеланокортина и гормона роста через конститутативный путь [240], а также нарушение созревания про-нейротензина и промеланоцитстимулирующего гормона [236]. Это приводит к многочисленным эндокринным нарушениям, включая гиперинсулинемию и бесплодие [84, 178].

Физико-химические свойства, субстратная специфичность, тканевая, клеточная и субклеточная локализация, особенности изменения активности фермента при различных фармакологических воздействиях на культуры клеток, нарушение синтеза нейропептидов у мышей с дефектной КП Н свидетельствуют о том, что исследуемый фермент вовлекается в процессинг многих биологически активных пептидов, таких как вазопрессин, окситоцин, нейротензин и меланоцитстимулирующий горомон, вещество Р, энкефалины и др. [122, 147, 148, 152, 182, 215, 225, 235, 236, 275]. Кроме того, изменение уровня мРНК КП Н и активности фермента под действием глюкокортикоидов [10, 186, 232, 265], половые отличия в уровне активности фермента [44], обусловливают интерес к изучению КП Н при введении половых стероидных гормонов.

**1.2.2. ФМСФ-ингибируемая карбоксипептидаза**

Первые упоминания о существовании фермента, отщепляющего аргинин и лизин с С-конца пептидов, но в то же время отличающегося от всех известных металлокарбоксипептидаз, относятся к 1993 году [7]. Более подробные сведения появились в 1995 году [11, 13].

Фенилметилсульфонилфторид-ингибируемая карбоксипептидаза (ФМСФ-ингибируемая КП) отщепляет остатки основных аминокислот с карбоксильного конца пептидов. По данным тонкослойной хроматографии фермент расщепляет дансил-Phe-Leu-Arg с образованием только дансил-Phe-Leu и аргинина, дальнейшего расщепления дансил-Phe-Leu не происходит [11]. Он имеет молекулярную массу 100-110 кДа и проявляет максимальную активность при pH 6,0-6,5 [11]. 1 мМ фенилметилсульфонилфторид (ФМСФ) и р-хлоромеркурбензоат полностью ингибируют фермент. Под дейстивием иодоацетамида карбоксипептидазная активность снижается только на 40%. Другие реагенты на SH-группы (N-этилмалеимид), хелатирующие агенты (ЭДТА) и специфический ингибитор КП Н (ГЭМЯК), а также ионы Co2+ не оказывают влияния на активность фермента. ФМСФ-ингибируемая КП инактивируется при нейтральных и слабощелочных значениях pH, но стабилизируется NaCl [9]. Km для синтетических субстратов дансил-Phe-Leu-Arg и дансил-Phe-Ala-Arg имеет значения 48 и 96 мМ, соответственно.

ФМСФ-ингибируемая карбоксипептидаза по своим физико-химическим свойствам схожа с лизосомальной карбоксипептидазой А (лизосомальная КП А, катепсин А, КФ 3.4.16.1), но отличается от нее субстратной специфичностью и распределением активности в тканях и отделах мозга [73, 93, 139, 188, 189, 194, 230].

Тканевое и региональное распределении ФМСФ-ингибируемой КП изучено у нескольких видов млекопитающих [8, 13, 44, 45]. У ежа европейского (Erinaceus europaeus) наиболее высокая активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы обнаружена в гипофизе, несколько ниже (в порядке убывания) – в семенниках, легких, почках, надпочечниках и селезенке. При этом активность в гипофизе примерно в 2 раза выше, чем в селезенке [13]. У кошки максимальная активность отмечена также в гипофизе, затем в порядке снижения активности следуют семенники, надпочечники, печень и почки [8]. У крысы максимальная активность данного фермента обнаружена в надпочечниках. В гипофизе активность была в 1,6 раза меньше, а в семенниках – в 2,5 раза меньше, чем в надпочечниках [44, 45]. В отделах головного мозга активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы у ежа в 3-4 раза (у кошки – в 4-10 [8]) ниже, чем в гипофизе, и в 2 раза ниже, чем в периферических тканях [13]. В порядке снижения активности фермента отделы головного мозга можно расположить следующим образом: 1) у ежа – серое вещество больших полушарий, мозжечок, гиппокамп, гипоталамус, обонятельные доли, стриатум, варолиев мост, продолговатый мозг, четверохолмие; 2) у кошки – серое вещество больших полушарий, мозжечок, гипоталамус, четверохолмие, варолиев мост, белое вещество больших полушарий, спинной мозг; 3) у крысы – гипофиз, обонятельные луковицы, большие полушария, гипоталамус, стриатум, мозжечок, гиппокамп, четверохолмие [8, 12, 13, 44, 45].

Таким образом, в отделах мозга, богатых телами нейронов, активность фермента выше, чем в проводящих путях [8, 13].

Имеются данные о возрастных изменениях активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы в мозге и периферических тканях самцов крыс в период с рождения до 120-дневного возраста [12]. В надпочечниках новорожденных крыс обнаруживается наибольшая активность фермента, которая постепенно снижается к 90-му и вновь повышается к 120-му дню. В гипофизе максимальная активность данного фермента обнаружена у 120-дневных крыс. В гипоталамусе активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы повышается со дня новорожденности до 20-го дня, затем снижается к 90-му и вновь повышается к 120-му дню постнатальной жизни. В семенниках наблюдается обратная динамика: максимальная активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы отмечена у новорожденных крысят, затем активность снижается к 30-му и практически не изменяется до 120-го дня.

Обнаружены половые различия в активности ФМСФ-ингибируемой КП [12, 44, 45]. Активность ФМСФ-ингибируемой КП отличается у самцов и самок и изменяется в период полового созревания. На 30-ый день постнатального периода у крыс обнаружены достоверные половые отличия в активности данного фермента в гипофизе и гонадах; на 60-ый день – в гипоталамусе. Максимальные отличия активности ФМСФ-ингибируемой КП в гипофизе, гипоталамусе, надпочечениках и половых железах выявлены у полностью половозрелых самцов и самок (к 120-му дню).

Следует также отметить, что у самок активность фермента в меньшей степени зависит от возраста, чем у самцов [44, 45].

Имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют сделать предположение о возможном участии ФМСФ-ингибируемой КП в процессинге предшественников ряда нейропептидов [12, 44, 45]. Характер изменений активности данного фермента в онтогенезе, а также наличие различий в активности между самцами и самками, предполагает возможность участия ФМСФ-ингибируемой КП в процессах, связанных с половой дифференцировкой, в частности, в обмене нейропептидов, регулирующих половую функцию. В связи с этим представляет интерес изучение активности ФМСФ-ингибируемой КП при введении половых стероидных гормонов.

**1.3. Половые стероидные гормоны**

Гормоны служат важными регуляторами различных физиологических процессов, а также поведения животных и человека. Действие этих биологически активных веществ распространяется на все органы и системы организма. Половые железы продуцируют довольно много стероидов, но лишь незначительная их часть обладает гормональной активностью. Образование этих гормонов строго регулируется с помощью петли обратной связи, включающей в себя гипофиз и гипоталамус. Необходимо отметить, что образование половых стероидов не является прерогативой гонад. Определенный вклад в этот процесс вносят и надпочечники. Именно поэтому часто гипоталамус (источник рилизинг-факторов), гипофиз (орган, в котором синтезируются ЛГ, ФСГ), надпочечники и половые железы (основные источники половых стероидов) объединяют в одну систему – гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадную (ГГНГС), которая участвует в регулировании важных биологических функций организма.

Одними из половых стероидных гормонов, влияющих на уровнь регуляторных пептидов, являются тестостерон и прогестерон [32, 164, 175, 245, 266].

**1.3.1. Тестостерон**

Тестостерон является основным мужским половым гормоном (в норме на его долю приходится около 90% от всех секретируемых андрогенов [27]). 90% этого гормона продуцируется семенниками, 5% – корой надпочечников и 5% образуется в результате метаболизма других стероидных гормонов в неэндокринных органах [27].

Тестостерон, как и другие андрогены, относится к группе С19-стероидов (андростановая группа). Его синтез в клетках Лейдига регулируется лютеинизирующим гормоном (ЛГ) передней доли гипофиза.  
Скорость-лимитирующим этапом в синтезе тестостерона является отщепление боковой цепи холестерина. Основной путь образования прогестероновый или Δ4-путь: прегненолон 🡪 прогестерон 🡪 17α-гидроксипрогестерон 🡪 андростендион 🡪 тестостерон [24], причем превращение холестерина в прегненолон при участии цитохрома-Р450, отщепляющего боковую цепь (Р-450обц), в надпочечниках, яичниках и семенниках происходит идентично [32].

В крови большинства млекопитающих (в том числе и человека) циркулирующий гормон на 97-99% связан с белками плазмы, преимущественно с β-глобулином – секс-гормон-связывающим глобулином или тестостерон-эстроген-связывающим глобулином, а также с альбумином [24, 27, 32]. В семенниках тестостерон специфически связан с андрогенсвязывающим белком, синтезируемым под влиянием фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) передней доли гипофиза в клетках Сертоли. Благодаря андрогенсвязывающему белку, достигается большая, по сравнению с ситемной кровью, концентрация тестостерона, которая необходима для созревания и дифференцировки половых клеток [24, 32]. Секс-гормон-связывающий глобулин связывает тестостерон с относительно высоким сродством и ограниченной емкостью [32]. Следует отметить, что связывание тестостерона с СГСГ происходит с большим сродством, чем других половых стероидных гормонов, например эстрадиола. Поэтому колебания количества данного белка в плазме крови существенно отражаются на концентрации свободного тестостерона, как раз и обладающего биологической активностью [32, 205].

Период полураспада тестостерона в плазме крови колеблется от 40 до 100 мин [42, 192]. Метаболическая деградация тестостерона протекает двумя основными путями. Первый – наиболее эффективный – происходит, главным образом, в печени. Он заключается в окислении атома углерода в 17-положении. В результате образуются 17-кетостероиды (17-оксостероиды), полностью лишенные или обладающие более слабой активностью, чем исходное соединение. Эти метаболиты в значительной части конъюгируют с сульфатом, с образованием водорастворимых соединений. В этом состоянии они выводяться через почки [24, 27, 32]. Часть 17-кетостероидов эксекретируется с желчью в кишечник [27].

При реализации второго пути инактивации тестостерона происходит восстановление двойной связи кольца А и 3-кетогруппы. При этом образуется активный метаболит – дигидротестостерон (ДГТ). Данный процесс катализируется НАДФН-зависисмой 5α-редуктазой и осуществляется непосредственно в тканях-мишенях [32]. Необходимо отметить, что ДГТ обладает большей по сравнению с тестостероном андрогенной активностью, большим сродством с СГСГ, и является тем соединением, посредством которого тестостерон осуществляет свое воздествие на ткани-мишени [32, 39].

Небольшая часть (1-5%) тестостерона подвергается ароматизации и превращается в эстрадиол. Данный процесс особенно важен для мозга, где эти гормоны участвуют в формировании полового поведения [24, 32, 39, 60, 166, 233].

У некоторых видов животных 5β-производные тестостерона стимулируют образование эритроцитов [39], но в основном 5β-ДГТ является неактивным метаболитом [111].

Основной физиологический эффект тестостерона – анаболический, то есть гормон обладает способностью стимулировать или ингибировать различные ферменты, участвующие в синтезе белка [24]. Этот гормон через андрогеновые рецепторы принимает участие в контроле развития жировой ткани [97], ингибирует экспрессию липопротеин-липазы и, при наличии гормона роста, заметно увеличивает липолиз через множественные взаимодействия по липолитическому каскаду [67]. Тестостерон увеличивает содержание b-серий ганглиозидов в почках крыс, но не влияет на содержание белков и сиалогликопротеидов [53]. Кроме того, данный гормон в высоких концентрациях обращает вызванный кастрацией эффект увеличения активности сиалотрансферазы I и сиалотрансферазы II в почках [53]. Способен значительно увеличивать продукцию секретируемого компонента в концевых клетках слезной железы крыс in vitro [261].

In vivo тестостерон снижает активность 11β-гидроксистероид дегидрогеназы [218]. Он повышает общий уровень гомоцистеина в плазме самок [129].

Интересно отметить влияние тестостерона, через ДГТ, на синтез ”простатического специфического антигена” (ПСА). Последний является гликопротеином, состоящим из одной полипептидной цепи (273 аминокислотных остатка) с пятью дисульфидными связями. Молекулярная масса с учетом микрогетерогенности по полисахариду составляет 30-33 кДа. ПСА в ткани предстательной железы и ее секрете обладает химотрипсинподобной активностью с каталитической триадой Gis41-Asp96-Ser189 и относится к сериновым протеазам [29].

Кроме того, ПСА обнаружен не только у мужчин, но и у женщин. В частности, в клетках рака молочной железы T47-D происходит синтез мРНК и белка ПСА. Однако это возможно лишь при стимуляции стериодными гормонами (прогестероном, ДГТ и в меньшей степени тестостероном и альдостероном). Эстрогены блокируют синтез ПСА [29].

Помимо этого тестостерон регулирует и множество других физиологических процессов через специфические рецепторы, число которых может повышаться либо понижаться [68, 78]. Этот гормон регулирует через ДГТ синтез андрогеновых рецепторов внутри клеток эндометрия [2], контролирует экспрессию 5α-редуктазы типа 2 в мозгу [201]. In vitro тестостерон снижает уровни мРНК рецепторов прогестерона, эстрогенов и андрогенов в клетках стромы эндометрия человека [162]. Этот гормон непосредственно (через андрогеновые рецепторы) подавляет экспрессию гена гонадотропин-рилизинг-фактора в гипоталамусе [63]. Он авторегулирует экспрессию мРНК собственных рецепторов в семенниках и стимулирует экспрессию андрогеновых рецепторов в клетках гранулезы растущих фолликулов [78, 278].

Интересно отметить тот факт, что при стрессе уровень тестостерона в плазме повышается. Причем секреция тестостерона стимулируется АКТГ [106].

В период половой зрелости у самок крыс тестостерон снижает связывание инсулина (посредством снижения числа поверхностных рецепторов в гепатоцитах) и еще более уменьшает его деградацию [167].

Ряд авторов отмечают тесную взаимосвязь между уровнями тестостерона, прогестерона и гормонами задней доли гипофиза (окситоцином, Arg8-вазопрессином и др.) [214, 266]. В частности тестостерон (в концентрации 0,01-0,1 мкг на мл), выступая в качестве предшественника 17β-эстрадиола, увеличивает in vitro секрецию окситоцина гранулезными клетками яичников. При более высоких концентрациях наблюдается обратный эффект – ингибирование секреции [274]. Тестостерон влияет на экспрессию пролактина в дорсальной и латеральной простате [213] и может выступать в качестве стимулятора секреции пролактин-подобного пептида клетками яичников [245]. Этот гормон в некоторой степени ингибирует высвобождение Arg8-вазопрессина из гипоталамических срезов in vitro [175]. Окситоцин, Arg8-вазопрессин и Arg8-вазотоцин участвуют в регуляции секреции тестостерона и прогестерона [214]. Кроме того, имеются данные о том, что уменьшение рецепторов окситоцина при старении в обонятельных луковицах и гипоталамическом вентромедиальном ядре связано со снижением уровня тестостерона в плазме [56].

Тестостерон (в отличие от прогестерона) не оказывает влияния на аккумуляцию кальцитонин-ген-зависимого пептида ни в ядрах тройничного нерва, ни в шейном отделе позвоночника [208]. С другой стороны, по мнению авторов [208], факт наличия кальцитонин-ген-зависимого пептида в гипоталамусе только самцов, свидетельствует о положительном эффекте тестостерона.

На клеточном уровне тестостерон способствует увеличению (а прогестерон – уменьшению) зоны гранулярных микротрубочек в клетках подчелюстной железы крыс [90], играет ведущую роль в регуляции транспорта Ca2+ в клетках миометрия [252], стимулирует продукцию цАМФ в клетках яичников свиньи [244].

Тестостерон и другие андрогены в виде 5α-редуцированных производных оказывают влияние на клетки ЦНС [200], вместе с прогестинами способствуя их дифференцировке на ранних этапах онтогенеза [193, 198]. При этом отмечается отсутствие половых различий в содержании мРНК андрогеновых рецепторов в латеральной перегородке, вентромедиальном ядре или аркуатном ядре [193]. Кроме того известно, что андрогены, регулируя ароматазную активность на уровне экспрессии гена в медиальной преоптической зоне и других компонентах мозга, опосредует половое поведение самцов. Так, для активации спаривания необходима ароматизация тестостерона в эстрадиол [233]. Это позволяет сделать предположение, что тестостерон и/или его эстрогенные метаболиты определяют в развивающемся мозге поло-специфичную способность к ароматизации. Они также вовлекаются в регулирование андрогенного ответа внутри компонентов нервной зоны, которые опосредуют половое поведение самцов [60, 166, 233].

Тестостерон способен оказывать влияние на синтез прогестерона in vitro [264].

**1.3.2. Прогестерон**

Прогестерон относится к прогестинам, или гестагенам (лат. gestatio – беременность), то есть к гормонам, благоприятствующим развитию беременности. По химическому строению принадлежит к прегнановой (С21) группе.

Синтез и секреция прогестерона осуществляется желтым телом яичников под влиянием ЛГ. При беременности (после 6-8 недель) основным источником данного гормона становится плацента, продуцирующая на поздних стадиях в 30-40 раз больше прогестерона, чем желтое тело [32]. Кроме того, как известно, прогестерон является промежуточным продуктом при синтезе многих других стероидных гормонов (андрогенов, минералокортикоидов, глюкокортикоидов). Поэтому немаловажную роль в создании общего пула прогестерона в крови играют надпочечники. Здесь секреция прогестерона находится под контролем АКТГ [40]. В плазме крови значительная часть прогестерона связывается с транскортином (кортикостероид-связывающий белок, синтез которого осуществляется в печени), альбумином и оросомукоидом [32, 27]. Биологической активностью, как и в случае с тестостероном, обладает свободная (несвязанная) форма гормона. Количество прогестерона в плазме изменяется в широких пределах (у человека от 0,3 до 15 пг/мл [27]) и зависит от фазы эстрального цикла. Период полураспада прогестерона в плазме крови составляет 90-105 мин [42].

Некоторые исследователи [40] отмечают, что изменение уровня прогестерона в крови в течение эстрального цикла обусловлено секрецией прогестерона надпочечниками. Максимальная концентрация достигается после овуляции, а именно после спада овуляторной волны ЛГ. С другой стороны предполагают, что именно прогестерон надпочечников является стимулятором овуляторной волны ЛГ [40]. Необходимо отметить определенную взаимосвязь в синтезе надпочечниками прогестерона и других стероидов. В стадии проэструса, когда происходит выброс овуляторной волны ЛГ, концентрация глюкокортикоидов достигает своего максимального значения [40]. Известно также, что глюкокортикоиды повышают чувствительность яичников к гонадотропинам (ЛГ и ФСГ) как у взрослых, так и у неполовозрелых животных [40]. Кроме того, концентрация прогестерона в плазме крови изменяется в течение суток. Эти изменения в основном сопадают с циркадным ритмом кортикостерона [32, 40]. Подобное совпадение, по всей вероятности, обусловлено суточным ритмом высвобождения АКТГ [32]. С другой стороны, у сокола Falco cherrug обнаружена обратная взаимосвязь между уровнем прогестерона и кортикостерона в крови [47].

Прогестерон инактивируется в печени, где образует ряд соединений. Основной путь метаболизма – восстановление, с образованием прегнандиола [24, 32]. Через почки выводится, главным образом, в виде прегнандиол-20-глюкуронида натрия.

Главный физиологический эффект прогестерона заключается в подготовке эндометрия, путем разрыхления субгландулярной стромы, к имплантации бластоцита и создании благоприятных условий для его развития [24, 27, 39]. Кроме того, прогестерон расслабляет гладкую мускулатуру матки и понижает ее чувствительность к окситоцину [24, 27, 39]. Экзогенный прогестерон способствует увеличению уровня свободного холестерина в плазматических мембранах клеток, что вызывает изменение свойств последних (увеличивается вязкость, уменьшается проницаемость для ионов и молекул) [41]. Ткачева Н.Ю. объясняет данный эффект стимулирующим влиянием прогестерона на липогенез в печени и жировой ткани, повышением липопротеинлипазной активности, ингибированием липолиза, а также возможным участием в этом процессе инсулина (при введении прогестерона наблюдается повышение секреции инсулина) [41, 137]. Таким образом, действие прогестерона на жировую ткань противоположно эффекту тестостерона [67].

Прогестерон in vitro ингибирует секрецию катехоламина, вызванную ацетилхолином или никотином в клетках мозгового слоя надпочечников, возможно через блокаду притока Ca2+ [86]. In vitro этот гормон увеличивает содержание в олигодендроцитах основного миелинового пептида и циклонуклеотидфосфодиэстеразы [164]. Кроме этого, in vitro рассматриваемый половой стероид способен (в зависимости от дозы) снижать уровни мРНК рецепторов эстрадиола, андрогенов и своих собственных в клетках стромы эндометрия [162]. Он способен снижать продукцию тестостерона у эмбрионов (при этом увеличивается уровень циркулирующего ЛГ) [228]. Прогестерон стимулирует реинициацию, дальнейшее развитие и мейоз ооцитов in vitro [243]. Он также активирует продукцию цАМФ и цГМФ в клетках яичников свиньи [244] и ингибирует секрецию пролактин-подобного пептида клетками яичников [245]. Этот гормон ингибирует активность 5α-редуктазы в коже гениталий [79]; повышает активность 11β-гидроксистероид-дегидрогеназы в норме и у адреноэктомированных крыс [218] и ингибирует активность N-деметилазы, участвующей в N-деметилировании этилморфина [127]. Прогестерон оказывает влияние и на иммунный ответ организма. В частности, контролирует способность макрофагов участвовать в иммунном ответе [204].

Прогестерон in vivo ингибирует продукцию окситоцина в гипофизе [32], но in vitro в физиологических дозах стимулирует секрецию этого пептида в фолликулах [274]. У самок, перед родами, увеличение уровня мРНК окситоцина в паравентрикулярном и супраоптическом ядрах гипоталамуса связано со спонтанным спадом уровня прогестерона. В то же время уровень мРНК Arg8-вазопрессина в этих отделах гипоталамуса не подвержен влиянию уменьшения уровня прогестерона [266].

Прогестерон вместе с эстрогенами препятствует началу лактации во время беременности, блокируя действие пролактина на молочные железы [39]. Рассматриваемый гормон увеличивает аккумуляцию кальцитонин-ген-зависимого пептида в ядрах троиничного нерва [208].

Прогестерон увеличивает как связывание, так и деградацию инсулина в гепатоцитах, причем увеличение деградации превышает увеличение связывания [167].

In vivo рассматриваемый гормон способствует снижению базального уровня интерлейкина-6 [52] и высвобождению интерлейкина-1 [174]. При этом in vitro уменьшает индуцированное интерлейкином-1 разрушение хрящей [88]. С другой стороны, интерлейкин-1β в культуре клеток гранулезы яичника крысы стимулирует деградацию прогестерона [99].

Эндогенный прогестерон играет определенную роль в контроле активности раковых новообразований [51, 70]. В частности, через свои ядерные рецепторы он регулирует рост и развитие рака груди [231], индуцирует дозозависимое увеличение уровня фактора роста сосудистого эндотелия и ”простатического специфического антигена” в клетках Т47-D рака груди [29, 157].

Прогестерон модулирует активность цистиновой аминопептидазы как у самок, так и у самцов [191].

Таким образом, факты, свидетельствующие о влиянии тестостерона и прогестерона на функционирование пептидергических систем [2, 67, 167, 175, 213, 214, 245, 274, 266, 277 и др.], а также на активность некоторых протеолитических ферментов [24, 67, 127, 191 и др.], позволяют предположить, что эти половые стероиды могут участвовать в регуляции обмена нейропептидов. В связи с этим представляет интерес изучение активности ферментов обмена нейропептидов: КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП при введении тестостерона и прогестерона.

Гонады (семенники и яичники) являются основными источниками половых стероидов в организме. Регуляция функции половых желез происходит под влиянием гормонов аденогипофиза – фоллитропина (фолликулостимулирующий гормон, ФСГ) и лютропина (лютеинизирующий гормон, ЛГ) [24, 27, 32, 39, 42]. Первый осуществляет морфофункциональную регуляцию, то есть усиливает деятельность клеток Сертоли (в семенниках) и активирует развитие фолликулов (в яичниках), что способствует выработке сперматозоидов и яйцеклеток. ЛГ ответственен непосредственно за выработку мужских и женских половых гормонов: андрогенов, эстрогенов и прогестинов [27, 32]. В то же время, синтез ФСГ и ЛГ контролируется гонадотропин-рилизинг-фактором (ГнРФ). Секреция последнего регулируется по принципу длинной (половые гормоны ингибируют секрецию ГнРФ), короткой (ингибиторное влияние гонадотропинов) и ультракороткой (гонадотропин-рилизинг фактор ингибирует свою собственную секрецию) обратной связи [27, 32, 63, 145]. Поэтому гипоталамус, гипофиз и половые железы объединяют в одну систему – гипоталамо-гипофизарно-гонадную (ГГГС) [24, 27, 39, 42].

С другой стороны, в надпочечниках также синтезируются тестостерон и прогестерон [27, 32]. Синтез стероидных гормонов надпочечников находится под влиянием кортикотропина. Следует отметить, что АКТГ стимулирует синтез не только кортикостероидов, но и половых гормонов [40, 32]. Секреция АКТГ, в свою очередь, зависит от синтеза кортиколиберина – рилизинг фактора гипоталамуса [27, 32, 39]. Принцип регуляции синтеза и секреции этого нейрогормона такой же, как и в случае ГнРФ, то есть половые гормоны, гонадотропины и сам АКТГ ингибируют высвобождение этого нейрогормона [24, 32, 39]. Поэтому гипоталамус, гипофиз и надпочечники объединяют в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую систему (ГГНС) [24, 27, 42].

Таким образом, при исследовании влияния половых гормонов, ГГГС и ГГНС можно рассматривать как единую гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадную систему (ГГНГС).

Следует также отметить, что в гипофизе и гипоталамусе обнаружена высокая активность КП Н, а в надпочечниках и половых железах – высокая активность ФМСФ-ингибируемой КП у многих видов животных [12, 44, 45, 81, 117, 122, 165, 180, 222, 225, 256, 262 и др.]. Именно поэтому активность ферментов определяли в гипоталамусе, гипофизе, надпочечниках и половых железах самцов и самок мышей.

**ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**2.1. Материал исследования**

Опыты проводили на самках и самцах белых беспородных мышей в возрасте 90-100 дней. Использовали следующие препараты половых стероидных гормонов: пропионат тестостерона (АО ”Эмпилс” завод ”Фармадон”, г. Ростов-на-Дону), прогестерон (АО ”Эмпилс” завод ”Фармадон”, г. Ростов-на-Дону), а также оливковое масло. В качестве специфических ингибиторов применяли ФМСФ (Serva”, США) и ГЭМЯК (“Serva”, США). Все остальные реактивы были отечественного производства с квалификацией ”ХЧ” и ”ОСЧ”.

**2.2. Методы исследования**

**2.2.1. Метод введения половых стероидных гормонов**

При изучении влияния половых гормонов на КП Н и ФМСФ-ингибируемую карбоксипептидазу in vivo все препараты вводились внутрибрюшинно в виде растворов в оливковом масле. Вводимый объем был равен 0,1 мл. Дозы половых гормонов были следующими: 1) 3 и 30 мг на кг массы в случае пропионата тестостерона; 2) 1 и 10 мг на кг массы в случае прогестерона. Контрольным животным вводили равный объем оливкового масла. В работе использовали следующие группы животных.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Группа | Пол | Вводимое вещество | Доза |
| 1 | Самки | Пропионат тестостерона | 3 мг на кг массы тела |
| 2 | Самцы | Пропионат тестостерона | 3 мг на кг массы тела |
| 3 | Самки | Пропионат тестостерона | 30 мг на кг массы тела |
| 4 | Самки | Прогестерон | 1 мг на кг массы тела |
| 5 | Самцы | Прогестерон | 1 мг на кг массы тела |
| 6 | Самки | Прогестерон | 10 мг на кг массы тела |
| 7 | Самцы | Оливковое масло | – |
| 8 | Самки | Оливковое масло | – |
| 9 | Самцы | – | – |
| 10 | Самки | – | – |

Животных декапитировали через 0,5, 4 и 24 часа после инъекции. Затем извлекали головной мозг, половые железы, надпочечники и помещали их в охлажденный до 4оС физиологический раствор (0,9% раствор хлорида натрия в воде). Все дальнейшие процедуры, если не оговорено иначе, проводили при 4оС.

Головной мозг тщательно очищали от оболочек, кровеносных сосудов и извлекали гипофиз и гипоталaмус.

Яичники и надпочечники тщательно очищали от жира.

Образцы тканей хранили при температуре -20оС не более одного месяца до использования.

Для исследования влияния половых гормонов на КП Н и ФМСФ-ингибируемую карбоксипептидазу in vitro гомогенаты тканей инкубировали с гормонами или оливковым маслом в течение 60 мин при 4оС. Концентрации гормонов соответствовали дозам при введении in vivo. Затем определяли активность ферментов как описано ниже.

Для определения активности ферментов образцы тканей взвешивали, а затем гомогенизировали в 50 мМ натрий-ацетатном буфере (pH 5,6), содержащем 50 мМ хлорида натрия в соотношении 1:400 (вес:объем).

**2.2.1. Метод определения активности карбоксипептидазы Н**

Активность КП Н определяли флюорометрическим методом по Supattapone S., Fricker L.D., Snyder S.H. [262].

Для определения активности фермента смешивали 150 мкл (в случае контрольной пробы) или 140 мкл (в случае опытной пробы) вышеуказанного буфера с 50 мкл гомогената ткани. Опытные пробы содержали 1 мкМ ГЭМЯК. Пробы преинкубировались 8 мин при 37оС.

Реакцию начинали прибавлением 50 мкл 210 мкМ дансил-Phe-Ala-Arg на 50 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,6 (конечная концентрация в реакционной смеси составляла 42 мкМ). Далее пробы инкубировали 60 мин при 37оС. Реакцию останавливали прибавлением 50 мкл 1М раствора соляной кислоты. Для экстракции продукта реакции – дансил-Phe-Ala – к пробам приливали 1,5 мл хлороформа и встряхивали в течение 60 сек. Для разделения фаз пробы центрифугировали 5 мин при 1000 g. Измерение флюоресценции хлороформной фазы проводили на флюориметре ФМЦ-2 в кювете толщиной 1 см при λex=360 нм и λem=530 нм. В качестве стандарта использовали 1 мкМ раствор дансил-Phe-Ala в хлороформе.

Активность КП Н определяли как разность в накоплении продукта реакции в пробах, несодержащих и содержащих ГЭМЯК, и выражали в нмоль дансил-Phe-Ala образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

**2.2.2. Метод определения активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы**

Активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы определяли флюориметрическим методом [7, 11]. К 150 мкл, в случае контрольной пробы, и к 140 мкл, в случае опытной пробы, вышеуказанного буфера прибавляли по 50 мкл гомогената.

В опытную пробу добавляли 10 мкл 25 мМ раствора ФМСФ, приготовленного на этиловом спирте (конечная концентрация ФМСФ в реакционной смеси составляла 1 мМ).

Дальнейшее определение активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы проводилось так же, как и для КП Н, с той лишь разницей, что вместо дансил-Phe-Ala-Arg в качестве субстрата использовали 50 мкл 210 мкМ дансил-Phe-Leu-Arg на 50 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,6.

Активность фермента определяли как разность в накоплении продукта дансил-Phe-Leu в пробах, несодержащих и содержащих ФМСФ. Активность выражали в нмоль дансил-Phe-Leu образовавшегося за 1 мин инкубации в пересчете на 1 мг белка.

**2.2.3. Метод определения концентрации белка**

Количество белка в пробах определяли по методу Lowry и соавт. [179].

**2.2.4. Статистическая обработка результатов исследования**

Достоверность отличий между средними определяли с использованием t-критерия Стьюдента [31]. Корреляционный и дисперсионный анализы проводили с помощью программы Statgraphics (версия 3.0) (“STSC, Inc.” США) в режимах Simple Correlation, One-Way ANOVA и Multifactor ANOVA. Принадлежность подгрупп животных к разным гомогенным группам оценивали с помощью Multiple range analysis (Statgraphics (версия 3.0) (“STSC, Inc.” США)). Принадлежность экспериментальных (временных) подгрупп к разным гомогенным группам проводили только в случае достоверности критерия Фишера. При этом оценивали количество гомогенных групп, образуемых экспериментальными подгруппами, с уровнем достоверности р<0,05. Баллы подгруппам присваивали на основании их принадлежности к разным гомогенным группам по мере увеличения среднего. При этом минимальный балл получала временная подгруппа с минимальным средним, максимальный балл – временная подгруппа с максимальным средним, а дробный балл (1,5) получали подгруппы, входящие одновременно в две гомогенные группы. На основании присвоеных баллов судили о динамике изменения активности ферментов.

**ГЛАВА 3. Результаты исследования**

**3.1. Тканевое распределение активности основных карбоксипептидаз у самцов и самок мышей**

**3.1.1. Распределение активности карбоксипептидазы Н в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадной системе самцов и самок мышей**

Полученные данные о распределении активности КП Н в ГГНГС самцов и самок мышей представлены в таблице 3.1.1.

Таблица 3.1.1. Распределение активности (нмоль дансил-Phe-Ala в мин на мг белка) КП Н у самцов и самок мышей (n=5÷8).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Пол  животного | Отдел ГГНГС, M±m | | | |
| Гипофиз | Гипоталамус | Надпочечники | Половые железы |
| Самцы | 1,41±0,10 | 0,78±0,02 | 0,16±0,04 | 0,10±0,02 |
| Самки | 4,63±0,63 | 1,88±0,29 | 0,54±0,08 | 0,40±0,08 |

Максимальная активность фермента у самцов обнаружена в гипофизе. В гипоталамусе активность была примерно в 2 раза ниже, а в надпочечниках и семенниках – в 9-15 раз ниже, чем в гипофизе.

У самок в порядке снижения активности КП Н ткани можно расположить следующим образом: гипофиз (максимальная активность), гипоталамус (активность, примерно, в 2,5 раза ниже), надпочечники, яичники (минимальная активность). Таким образом, распределение активности КП Н в ГГНГС мышей сходно с таковым у других видов животных [12, 44, 117, 122, 165, 182, 256, 262]. Однако обнаружены некоторые отличия между распределением активности КП Н у мышей разного пола. У самцов разница между активностью этого фермента в надпочечниках и таковой в гонадах составляет, примерно, 67%, а у самок – только 35%. У самок активность КП Н, в целом, примерно в 3,3 раза выше, чем у самцов.

**3.1.2. Распределение активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы в в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадной системе самцов и самок мышей**

Полученные данные о распределении активности ФМСФ-ингибируемой КП у самцов и самок мышей представлены в таблице 3.1.2.

Таблица 3.1.2. Распределение активности (нмоль дансил-Phe-Leu в мин на мг белка) ФМСФ-ингибируемой КП у самцов и самок мышей (n=5÷8).

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Пол  животного | Отдел ГГНГС, M±m | | | |
| Гипофиз | Гипоталамус | Надпочечники | Половые железы |
| Самцы | 0,75±0,08 | 0,30±0,01 | 1,51±0,12 | 0,66±0,04 |
| Самки | 2,69±0,11 | 1,63±0,09 | 6,72±0,46 | 7,93±0,56 |

У самцов максимальная активность исследуемого фермента обнаружена в надпочечниках. В гипофизе и семенниках активность ФМСФ-ингибируемой КП примерно в 2 раза, а в гипоталамусе – в 5 раз ниже, чем в надпочечниках.

У самок распределение активности этого фермента несколько отличается от такового у самцов. Наивысшие показатели активности были отмечены в яичниках и надпочечниках (в последних на 15% ниже, чем в первых). Минимальная активность ФМСФ-ингибируемой КП, также как и у самцов, обнаружена в гипоталамусе.

Таким образом, как у самцов, так и у самок, наиболее высокие показатели активности ФМСФ-ингибируемой КП в ГГНГС обнаружены в надпочечниках и половых железах – основных источниках половых стероидов в организме. У самцов активность ФМСФ-ингибируемой КП в надпочечниках на 127% выше, чем в семенниках; у самок в надпочечниках – на 15% ниже, чем в яичниках. У самок активность ФМСФ-ингибируемой КП в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системе примерно в 4,5 раза выше, чем у самцов.

Следует также отметить, что распределение активности ФМСФ-ингибируемой КП в тканях мышей сходно с таковым у других видов животных [8, 13, 12, 44, 45].

Таким образом, сравнивая распределение активности двух основных карбоксипептидаз в ГГНГС, можно заключить, что если активность КП Н и у самцов, и у самок, максимальна в гипофизе и гипоталамусе, то активность ФМСФ-ингибируемой КП – в надпочечниках и половых железах. Возможно, это связано с разной функциональной ролью данных ферментов в различных отделах ГГНС и ГГГС.

**3.2. Активность основных карбоксипептидаз у самок мышей при введении** **тестостерона и прогестерона**

Известно, что тестостерон и прогестерон оказывают влияние на уровень различных пептидных нейрогормонов в организме животных [67, 167, 175, 213, 214, 245, 266, 274], а также на активность некоторых протеолитических ферментов [24, 67, 127, 191] . В связи с этим представляет интерес изучение влияния данных половых стероидов на активность ферментов обмена нейропептидов: КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП.

**3.2.1. Активность карбоксипетидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы при введении тестостерона в тканях самок мышей**

Активность КП Н в гипофизе через 0,5 ч после введения тестостерона в дозе 3 мг на кг массы была выше на 61%, по сравнению с контрольной группой животных (рис. 3.2.1). Через 24 ч после введения тестостерона активность исследуемого фермента в гипофизе была на 16%, а в гипоталамусе и надпочечниках – на 45-50% ниже, чем у контрольных животных. В яичниках достоверных изменений активности КП Н не обнаружено. Снижение активности фермента в гипофизе и гипоталамусе через 24 ч после инъекции тестостерона в дозе 3 мг на кг массы может быть связано с тем, что экзогенный тестостерон подавляет выработку эндогенного тестостерона по механизму обратной связи посредством снижения уровня синтеза и секреции ЛГ и гонадотропин-рилизинг фактора [202]. Период полужизни экзогенного тестостерона составляет 40-100 мин [42, 192], то есть через 24 ч после введения экзогенный тестостерон полностью элиминируется, тогда как выработка эндогенного еще может быть подавлена. Это, вероятно, может приводить к снижению биосинтеза нейропептидов и к снижению активности КП H.

Активность КП Н у самок, которым вводили тестостерон в дозе 30 мг на кг массы, была ниже таковой у контрольных мышей в гипофизе и надпочечниках через 24 ч – на 29% и 55% соответственно (рис. 3.2.2). Через 0,5 и 4 ч после инъекции тестостерона в этих органах достоверных изменений активности КП Н не выявлено. В гипоталамусе активность этого фермента изменялась волнообразно: через 0,5 ч после введения активность была ниже на 36%, через 4 ч – на 22% выше, а через 24 ч – вновь ниже на 53%, по сравнению с контрольными животными. Только в этом отделе ГГНГС отмечено достоверное отличие во влиянии разных доз тестостерона. В яичниках активность КП Н достоверно не изменялась при введении тестостерона в дозе 30 мг на кг массы.

Для более полного понимания характера выявленных изменений активности основных карбоксипептидаз первичный экспериментальный материал бы подвергнут дисперсионному анализу влияния времени после инъекции при введении различных доз тестостерона (таблицы 3.2.1.1. и 3.2.1.2).

Статистически значимая динамика активности КП Н наблюдается только в гипоталамусе в случае введения тестостерона в дозе 30 мг на кг массы (таблица 3.2.1.2).

Дисперсионный анализ влияния времени и дозы гормона (таблица 3.2.1.3) показал отсутствие достоверной зависимости активности КП Н от дозы экзогенного тестостерона в исследованном диапазоне доз. Только в гипоталамусе обнаружено влияние взаимодействия времени после инъекции и дозы вводимого гормона на активность исследуемого фермента.

Таким образом, при введении различных доз тестостерона существенных отличий в активности КП Н у самок не обнаружено.

В гипофизе активность ФМСФ-ингибируемой КП после введения тестостерона (доза 3 мг на кг массы) через 0,5, 4 и 24 ч была ниже соответственно на 28, 61 и 59%, по сравнению с контролем (рис. 3.2.3). В гипоталамусе через 0,5 ч после введения активность исследуемого фермента не изменялась, а через 4 и 24 ч была на 35-40% ниже, чем у контрольных животных. В надпочечниках изменения в активности ФМСФ-ингибируемой КП отмечены только через 24 ч: повышение на 14% по сравнению с контрольными самками. В яичниках активность фермента через 0,5 и 24 ч была соответственно на 21 и 49% ниже, по сравнению с контролем.

Влияние тестостерона в дозе 30 мг на кг массы, в целом, сходно с таковым в дозе 3 мг на кг массы (рис. 3.2.4). При этом в гипофизе активность ФМСФ-ингибируемой КП во все исследуемые временные интервалы была ниже, по отношению к контрольным самкам (через 0,5 ч – на 39%, через 4 и 24 ч – на 62-68%). В гипоталамусе через 0,5 ч после инъекции активность этого фермента не отличалась от таковой у контрольных животных, а через 4 и 24 ч – была ниже на 35-40%. В надпочечниках изменений активности ФМСФ-ингибируемой КП не обнаружено. В яичниках достоверное изменение активности отмечено только через 24 ч послее введения тестостерона в дозе 30 мг на кг массы: снижение на 30% по отношению к контролю.

Дисперсионный анализ влияния времени после инъекции при введении различных доз тестостерона на активность ФМСФ-ингибируемой КП (таблицы 3.2.1.1. и 3.2.1.2) показал, что статистически значимая динамика изменения активности фермента наблюдается в гипофизе, гипоталамусе и яичниках. Причем динамика изменений активности фермента в этих отделах ГГНГС одинаковая – повышение активности ФМСФ-ингибируемой КП к 0,5 ч и снижение к 4 ч. В интервале 4-24 ч активность ФМСФ-ингибируемой КП статистически достоверно не изменялась.

Дисперсионный анализ влияния времени и дозы гормона (таблица 3.2.1.3) показал отсутствие зависимости активности ФМСФ-ингибируемой КП от дозы экзогенного тестостерона в исследованном диапозоне доз, а также от взаимодействия дозы и времени после введения.

Таким образом, как и в случае с КП Н, не обнаружено существенных отличий во влиянии различных доз тестостерона (3 и 30 мг на кг массы) на активность ФМСФ-ингибируемой КП.

Известно, что in vitro тестостерон в концентрации 0,01 и 0,1 мкг на мл увеличивает секрецию окситоцина клетками гранулезы яичников на 75 и 100% соответственно. Более высокая концентрация (10 мкг на мл) – ингибирует на 66% [274]. Таким образом, отличия в действии проявляются при разнице между дозами в 100-1000 раз. С другой стороны, дозы тестостерона, различающиеся в 5 раз (5 и 25 мкг), одинаково влияли на индекс веса тимуса у новорожденных самок мышей [110]. В настоящем исследовании дозы отличались между собой в 10 раз. Возможно, именно поэтому существенных отличий в изменении активности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП при введении тестостерона не выявлено.

В изменении активности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП обнаружены некоторые отличия при действии тестостерона в дозе 3 мг на кг массы. В гипофизе через 0,5 ч после инъекции мужского полового гормона активность КП Н возрастала, а активность ФМСФ-ингибируемой КП, наоборот, снижалась. С другой стороны, через 24 ч после введения в надпочечниках активность ФМСФ-ингибируемой КП повышалась, а КП Н – снижалась. Поскольку КП Н и ФМСФ-ингибируемая КП отличаются субстратной специфичностью [11, 147, 148], то возможно, подобное различие в изменении активности связано с участием исследуемых карбоксипептидаз в процессинге разных биологически активных пептидов, уровень которых в гипофизе и надпочечниках по-разному изменяется при введении тестостерона или прогестерона.

**3.2.2. Активность карбоксипетидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы при введении прогестерона в тканях самок мышей**

При введении прогестерона в дозе 1 мг на кг массы через 0,5 ч во всех отделах ГГНГС достоверных изменений активности КП Н не обнаружено (рис. 3.2.5). Через 4 ч после введения прогестерона только в гипофизе и яичниках наблюдалось достоверное изменение активности фермента – повышение, примерно, в 2 раза, по сравнению с контролем. Через 24 ч прогестерон в надпочечниках и гипоталамусе достоверно снижал активность КП Н соответственно в 1,8 и 2,3 раза, по сравнению с контролем. В других отделах ГГНГС в данном временном интервале (24 ч) активность КП Н достоверно не отличалась от таковой у контрольных самок.

Прогестерон в дозе 10 мг на кг массы в гипофизе через 0,5 и 4 ч вызывал достоверное повышение активности КП Н примерно в 1,9 раза, а через 24 ч – снижение в 1,7 раза (рис. 3.2.6). В гипоталамусе в начальный период времени (0,5-4 ч) достоверное изменение активности исследуемого фермента не выявлено. Через 24 ч активность КП Н по сравнению с контролем была ниже в 2,9 раза,. В надпочечниках прогестерон в дозе 10 мг на кг массы снижал активность КП Н через 0,5 и 24 ч примерно на 40%. При этом через 4 ч после введения активность фермента не отличалась от контроля. В яичниках достоверное изменение активности КП Н было обнаружено только в двух случаях: через 4 ч – активность фермента была выше в 2,3 раза, а через 24 ч – ниже в 5,6 раза, чем у контрольных животных.

Дисперсионный анализ влияния времени после введения различных доз прогестерона (1 и 10 мг на кг массы) на активность исследуемых ферментов представлен в таблицах 3.2.2.1 и 3.2.2.2. Активность КП Н в гипоталамусе постепенно снижалась к 24 ч после введения прогестерона в дозе 1 мг на кг массы. При этом в гипофизе наблюдалась колоколообразная динамика: повышение к 4 ч и снижение к 24 ч до уровня 0,5 ч. В яичниках и надпочечниках достоверного влияния времени после введения прогестерона в дозе 1 мг на кг массы на активность КП Н не выявлено. После введения более высокой дозы прогестерона (10 мг на кг массы) (таблица 3.2.2.2) в гипоталамусе и гипофизе активность исследуемого фермента не изменялась в интервале 0,5-4 ч, а затем снижалась к 24 ч. В яичниках наблюдалось повышение к 4 ч и снижение к 24 ч.

Дисперсионный анализ влияния времени после инъекции и дозы гормона (таблица 3.2.2.3) показал отсутствие статистически значимой зависимости активности КП Н от дозы экзогенного прогестерона (за исключением активности в надпочечниках). Известно, что КП Н участвует в процессинге энкефалинов, высокий уровень которых обнаружен в надпочечниках [122, 147, 151]. Кроме того, в надпочечниках обнаружено высокое содержание прогестерона [40]. Возможно, что через изменение активности КП Н прогестерон регулирует уровень активных форм энкефалинов.

Таким образом, при увеличении концентрации экзогенного прогестерона в 10 раз характер и сила воздействия, практически, не изменяются.

Следует отметить, если в гипофизе самок при введении тестостерона в дозе 3 мг на кг массы активность КП Н увеличивается через 0,5 ч после инъекции, то при введении прогестерона в дозе 1 мг на кг массы – только через 4 ч. Известно, что прогестерон в организме служит предшественником тестостерона [199]. Возможно, влияние прогестерона опосредуется преврещением в тестостерон. Вероятно, именно поэтому действие прогестерона на активность КП Н в гипофизе проявляется через больший промежуток времени по сравнению с влиянием тестостерона.

Экзогенный прогестерон (доза 1 мг на кг массы) вызывал  
 снижение активности ФМСФ-ингибируемой КП в гипофизе через 0,5 ч на 31%, а через 24 ч – в 4,2 раза (рис. 3.2.7). Через 4 ч после введения прогестерона достоверных отличий в активности ФМСФ-ингибируемой КП от контроля не обнаружено. В гипоталамусе через 0,5 ч активность исследуемого фермента не отличалась от таковой у контрольных самок, а через 4 и 24 ч была ниже на 30-33%. В надпочечниках изменений в активности ФМСФ-ингибируемой КП не обнаружено. В яичниках только через 24 ч наблюдалось достоверное снижение активности этого фермента в 2,3 раза по сравнению с контролем.

Активность ФМСФ-ингибируемой КП при введении прогестерона в дозе 10 мг на кг массы (рис. 3.2.8) через 0,5 ч снижалась только в гипофизе (на 30%), а через 24 ч – в гипофизе, гипоталамусе и яичниках на 74, 40 и 43% соответственно по отношению к контролю. Необходимо отметить, что сходные изменения активности ФМСФ-ингибируемой КП наблюдались и при введении прогестерона в дозе 1 мг на кг массы (рис. 3.2.7). В остальных случаях статистически значимых отличий в активности ФМСФ-ингибируемой КП от контроля не обнаружено.

Результаты дисперсионного анализа влияния времени после введения прогестерона на активность ФМСФ-ингибируемой КП приведены в таблицах 3.2.2.1 и 3.2.2.2. Активность ФМСФ-ингибируемой КП при введении прогестерона в дозе 1 мг на кг массы в яичниках и надпочечниках постепенно снижалась к 24 ч. В гипоталамусе активность фермента снижалась к 4 ч, после чего не изменялась вплоть до 24 ч. В гипофизе активность исследуемого фермента не изменялась в интервале 0,5-4 ч, а затем снижалась к 24 ч. После введения прогестерона в дозе 10 мг на кг массы активность ФМСФ-ингибируемой КП в гипоталамусе и надпочечниках снижалась к 4 ч и не изменялась до 24 ч. В яичниках происходило постепенное снижение активности фермента к 24 ч.

В гипофизе активность ФМСФ-ингибируемой КП не изменялась в интервале 0,5-4 ч, а затем снижалась к 24 ч.

В гипоталамусе самок при введении как тестостерона (в дозах 3 и 30 мг на кг массы), так и прогестерона (в дозах 1 и 10 мг на кг массы), динамика изменения активности ФМСФ-ингибируемой КП одинакова: снижение в интервале 0,5-4 ч и далее отсутствие изменений до 24 ч. В надпочечниках время после инъекции тестостерона в дозе 3 мг на кг массы не влияет на активность исследуемой карбоксипептидазы. Прогестерон в дозе 1 мг на кг массы вызывал плавное снижение активности фермента в интервале 0,5-24 ч. После введения высоких доз половых стероидных гормонов (30 мг на кг массы тестостерона и 10 мг на кг массы прогестерона) динамика изменения активности ФМСФ-ингибируемой КП в этом отделе ГГНГС была одинаковой: снижение активности к 4 ч и отсутствие изменений через 24 ч. В гипофизе и яичниках после введения тестостерона (как высокой, так и низкой дозы) активность ФМСФ-ингибируемой КП снижалась к 4 ч и не изменялась до 24 ч. После инъекций обеих доз прогестерона в гипофизе активность не изменялась в интервале 0,5-4 ч и снижалась к 24 ч, а в яичниках происходило постепенное снижение активности фермента в промежутке от 0,5 до 24 ч.

Согласно результатам дисперсионного анализа (таблица 3.2.2.3) доза прогестерона, а также взаимодействие дозы и времени после инъекции, не влияют на активность ФМСФ-ингибируемой КП в ГГНГС самок мышей.

Таким образом, как и при введении тестостерона активность КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП в ГГНГС самок мышей не зависит от дозы вводимого гормона (в исследованном диапозоне доз).

Необходимо отметить, что действие прогестерона на активность двух исследуемых карбоксипептидаз отличается. После введениия прогестерона в дозе 1 мг на кг массы в гипоталамусе активность КП Н оставалась неизменной в интервале 0,5-4 ч, затем снижалась к 24 ч, а активность ФМСФ-ингибируемой КП снижалась к 4 ч и далее не изменялась до 24 ч. В гипофизе активность ФМСФ-ингибируемой КП плавно уменьшалась к 24 ч, тогда как активность КП Н возрастала через 4 ч после инъекции. В надпочечниках и яичниках происходило постепенное снижение активности ФМСФ-ингибируемой КП к 24 ч. Статистически достоверной зависимости активности КП Н от времени после инъекции гормона не установлено. После введения прогестерона в дозе 10 мг на кг массы в гипофизе динамика изменения активности обеих карбоксипептидаз одинакова: неизменность в интервале 0,5-4 ч и снижение к 24 ч. В гипоталамусе активность КП Н была постоянной в итервале 0,5-4 ч и снижается к 24 ч, а активность ФМСФ-ингибируемой КП снижалась к 4 ч и оставалась на этом уровне до 24 ч. В яичниках активность КП Н повышалась к 4 ч, затем снижалась к 24 ч, а активность ФМСФ-ингибируемой КП постепенно снижалась к 24 ч.

Таким образом, активность обеих исследуемых карбоксипептидаз как в случае тестостерона, так и в случае прогестерона, практически не зависела от дозы вводимого полового гормона (в исследованном диапозоне доз).

**3.3. Активность основных карбоксипептидаз у самцов мышей при введении тестостерона и прогестерона**

В связи с отсутствием зависимости изменения активности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП от дозы вводимого гормона у самок, у самцов активность ферментов исследовалась только при введении тестостерона в дозе 3 мг на кг массы и прогестерона в дозе 1 мг на кг массы.

**3.3.1. Активность карбоксипетидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы при введении тестостерона в тканях самцов мышей**

Результаты исследования активности КП Н в ГГНГС самцов при введении тестостерона в дозе 3 мг на кг массы представлены на рис. 3.3.1. Через 0,5 и 4 ч после инъекции активность фермента в гипофизе по сравнению с контрольными самцами была ниже примерно на 40%. В гипоталамусе и надпочечниках на все исследованные временные интервалы активность КП Н не отличалась от контроля. В семенниках активность исследуемой карбоксипептидазы через 4 ч была в 1,9 раза выше, а через 0,5 и 24 ч не отличалась от таковой у контрольных животных.

Данные об изменении активности ФМСФ-ингибируемой КП при введении тестостерона в дозе 3 мг на кг массы представлены на рис. 3.3.2. По сравнению с контрольной группой, статистически достоверное увеличение активности ФМСФ-ингибируемой КП обнаружено только в гипофизе (на 21%) через 24 ч. В остальных отделах ГГНГС самцов изменений активности ФМСФ-ингибируемой КП не выявлено.

Таким образом, при введении тестостерона в дозе 3 мг на кг массы в гипофизе самцов активность КП Н снижалась в начальный период времени (0,5-4 ч), в то время как активность ФМСФ-ингибируемой КП повышалась через 24 ч.

**3.3.2. Активность карбоксипетидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы при введении прогестерона в тканях самцов мышей**

При введении прогестерона в дозе 1 мг на кг массы, в гипофизе через 0,5 ч активность КП Н была на 25% ниже, чем у контрольных самцов (рис. 3.3.3). В остальных отделах ГГНГС самцов изменений активности этого фермента не обнаружено.

У самцов, которым вводили прогестерон, активность КП Н в семенниках через 0,5 ч была в 3,3 раза выше, а через 4 и 24 ч – в 1,5-2 раза ниже, чем у животных, которым вводили тестостерон в дозе 3 мг на кг массы (рис. 3.3.3). В остальных отделах ГГНГС самцов отличий между активностью КП Н после введении тестостерона или прогестерона не обнаружено.

Прогестерон достоверно увеличивал активность ФМСФ-ингибируемой КП по отношению к контрольным животным в надпочечниках через 0,5 ч на 28%, а в семенниках – через 0,5 и 4 ч после инъекции, примерно, на 40% (рис. 3.3.4).

После введения прогестерона в гипоталамусе, гипофизе и надпочечниках влияния времени после инъекции на активность как КП Н, так и ФМСФ-ингибируемой КП не обнаружено (таблица 3.3.1). В семенниках время после инъекции достоверно влияло на активность КП Н: активность плавно снижалась к 24 ч.

Достоверной зависимости активности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП от времени после введении тестостерона во всех отделах ГГНГС самцов не обнаружено (таблица 3.3.1).

**3.4. Активность карбоксипетидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы in vitro при действии тестостерона и прогестерона**

Для выяснения механизма действия тестостерона и прогестерона на активность основных карбоксипептидаз в ГГНГС мышей in vivo было исследовано влияние данных половых стероидов in vitro (таблица 3.4).

Исходя из полученных данных можно сделать вывод, что ни один из гормонов не влияет на активность исследуемых ферментов. Другими словами, прямое влияние тестостерона или прогестерона на молекулы КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП, по-видимому, исключено.

Вместе с тем, в опытах in vivo активность обоих ферментов изменялась при введении гормонов. Следовательно, влияние тестостерона и прогестерона in vivo на активность КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП опосредуется какими-то внутриклеточными механизмами.

Сопоставление результатов дисперсионного анализа влияния времени после введения у самцов и самок (таблица 3.5.1) позволяет заключить, что тестостерон не влияет на динамику активности КП Н ни у самцов, ни у самок. В то же время, во влиянии прогестерона на активность КП Н в половых железах выявлены отличия: в яичниках гормон не влиял на динамику изменения активности, а в семенниках наблюдалось плавное снижение активности КП Н. Следует отметить, что в надпочечниках ни одно из вводимых веществ достоверно не влияло на динамику активности КП Н у животных обоего пола.

Результаты дисперсионного анализа влияния времени на активность ФМСФ-ингибируемой КП в тканях самцов и самок при введении различных веществ представлены в таблице 3.5.2. Достоверного влияния времени на активность ФМСФ-ингибируемой КП ни в одном отделе ГГНГС самцов не обнаружено.

С другой стороны, практически во всех изученных случаях наблюдается статистически значимая временная динамика активности ФМСФ-ингибируемой КП в тканях самок (таблица 3.5.2). При введении оливкового масла во всех отделах ГГНГС, исключая гипофиз, наблюдается повышение активности фермента к 0,5 ч и снижение к 4 ч. В интервале 4-24 ч активность ФМСФ-ингибируемой КП не изменялась. При введении оливкового масла активность исследуемого фермента была постоянной в интервале 0,5-24 ч. Оба половых гормона влияли на динамику активности исследуемого фермента в гипофизе, по сравнению с таковой при введении оливкового масла. После инъекции тестостерона активность повышалась к 0,5 ч, затем снижалась к 4 ч и не изменялась в интервале 4-24 ч. В тоже время, активность ФМСФ-ингибируемой КП после введения прогестерона не изменялась в интервале 0,5-4 ч и снижалась к 24 ч.

Следует также отметить, что в случае введения прогестерона в яичниках происходило плавное снижение активности ФМСФ-ингибируемой КП к 24 ч, тогда как в случае введения оливкового масла снижение наблюдалось уже к 4 ч.

Сопоставление результатов влияния тестостерона в дозе 3 мг на кг массы и прогестерона в дозе 1 мг на кг массы в ГГНГС самцов и самок мышей позволяет выделить следующие особенности.

При введении прогестерона активность КП Н в семенниках и активность ФМСФ-ингибируемой КП в яичниках изменялись сходным образом: плавное снижение к 24 ч (табл. 3.5.1. и 3.5.2).

В половых железах через 0,5 ч после инъекции прогестерон у самцов повышал, а тестостерон у самок – снижал активность ФМСФ-ингибируемой КП (рис. 3.3.4. и 3.2.3). При этом активность КП Н через 4 ч после инъекции у самцов повышается при введении тестостерона, а у самок – прогестерона (рис. 3.3.1. и 3.2.5).

В гипофизе через 4 ч активность КП Н у самцов при введении тестостерона снижается, а у самок при введении прогестерона повышается (рис. 3.3.1. и 3.2.5).

В гипофизе через 0,5 ч тестостерон у самок повышал активность КП Н, а у самцов снижал. В этом же органе, но через 24 ч после введения тестостерон у самок снижал активность ФМСФ-ингибируемой КП, а у самцов – повышал (рис. 3.2.1., 3.3.1. и 3.2.3., 3.3.2).

Выявленные отличия во влиянии половых стероидов на активность исследуемых карбоксипептидаз у самцов и самок могут быть, вероятно, связаны с отличиями в чувствительности ГГНГС самцов и самок к половым гормонам [75, 94], а также с половыми отличиями в функционировании пептидергических систем [2, 40].

Необходимо заметить, что влияние прогестерона и тестостерона как у самцов, так и у самок, всегда было однонаправленным. Возможно это обусловлено тем, что в организме животных первый является предшественником второго [24, 27, 32, 39], и следовательно, многие эффекты прогестерона опосредуются его превращением в тестостерон.

**ГЛАВА 4****. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Известно, что нейропептиды контролируют различные функции организма и участвуют во многих физиологических процессах, в том числе и связанных с размножением [55, 101, 126, 203, 207, 219]. Они регулируют синтез и секрецию половых стероидных гормонов [23, 24, 32, 39]. В то же время половые стероидные гормоны оказывают существенное влияние на функционирование пептидергических систем [2, 277]. Они влияют на уровень синтеза и секреции гонадотропинов [2], гонадотропин рилизинг-фактора [202], пролактина [38], АКТГ [277], рилизинг-фактора АКТГ [64], β-эндорфина [277] и др. С другой стороны, уровень биологически активных пептидов зависит от активности ферментов, участвующих в их обмене [1, 5, 22, 123, 147, 146, 148, 152]. Исходя из этого, очевидно, что изучение активности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП при введении тестостерона и прогестерона представляет значительный интерес, как для понимания роли ферментов, так и для понимания механизмов функционирования нейропептидов.

Приведенные в настоящей работе данные о распределении активности КП Н в ГГНГС самцов и самок мышей хорошо соотносятся с распределением активности фермента у других видов животных [112, 113, 121, 122]: максимальный уровнь обнаружен гипофизе и гипоталамусе, минимальный – в надпочечниках и половых железах. Таким образом, активность КП Н выше в тех отделах ГГНГС, в которых выше концентрация нейропептидов [169]. Это хорошо согласуется с биологической ролью фермента – участием в процессинге предшественников биологически активных пептидов.

В настоящее время имеются сведения о распределении активности ФМСФ-ингибируемой КП в ЦНС и периферических тканях ежа [13], крысы [12, 44, 45] и кошки [8]. Данные о распределении активности исследуемого фермента в ГГНГС мышей согласуются с таковыми у других видов животных [8, 12, 13, 44, 45]. У всех изученных видов млекопитающих наибольшая активность ФМСФ-ингибируемой КП обнаружена в надпочечниках, половых железах и гипофизе, то есть в органах, связанных с образованием нейропептидов, участвующих в нейрогуморальной регуляции функций организма. Установлено, что яичники продуцируют многие нейропептиды, в том числе окситоцин [4], релаксин [43], инсулиноподобные факторы роста [282], эндорфины и энкефалины [80], а функции семенников модулируются опиоидными пептидами [128]. Кроме того, известно, что клетки семенников способны связывать вещество Р [257]. Все это позволяет сделать предположение о возможном участии ФМСФ-ингибируемой КП в процессинге биоактивных пептидов.

Следует отметить, что активность обеих карбоксипептидаз у самок выше, чем у самцов. Активность КП Н во всех отделах ГГНГС самок в 2,5-4 раза выше, чем у самцов. В то же время, активность ФМСФ-ингибируемой КП в гипофизе и надпочечниках самок выше, чем у самцов в 3,6-4,5 раза, а в гипоталамусе и половых железах – в 5,4-12 раз. Полученные результаты согласуются с данными о половых отличиях в активности исследуемых карбоксипептидаз в ГГНГС крыс [44]. Не исключено, что выявленные различия связаны с половыми отличиями в функционировании ГГГС, ГГНС и пептидергических систем [2, 40, 55].

Обнаружено (таблица 3.1.1. и 3.1.2), что в гипофизе мышей, в котором синтезируются пептидные гормоны, активность КП Н примерно в 2 раза выше активности ФМСФ-ингибируемой КП. При этом в надпочечниках, в которых синтезируются преимущественно энкефалины, наоборот, активность ФМСФ-ингибируемой КП приблизительно в 10 раз выше таковой КП Н. Подобное различие может быть обусловлено разным набором и уровнем нейропептидов в гипофизе и надпочечниках [169], а также отличиями в субстратной специфичности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП [11, 12, 44, 45, 118, 147].

Влияние тестостерона и прогестерона на активность как КП Н, так и ФМСФ-ингибируемой КП, у мышей обоего пола всегда было однонаправленным. Обнаружено, что в гипофизе самок активность КП Н при введении тестостерона в дозе 3 мг на кг массы увеличивалась через 0,5 ч после инъекции, а при введении прогестерона в дозе 1 мг на кг массы – через 4 ч. Известно, что прогестерон в организме служит предшественником тестостерона [32, 199]. Вероятно, влияние прогестерона опосредуется превращением в тестостерон. Это предположение подтверждается также отсутствием влияния вида гормона на активность исследуемых карбоксипептидаз (таблица 4.1).

Таблица 4.1. Дисперсионный анализ влияния вида гормона на активность основных карбоксипептидаз в ГГНГС мышей.

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Фермент | Отдел ГГНГС | Критерий Фишера,  самцы | Критерий Фишера,  самки |
| Карбоксипептидаза Н | Гипоталамус | 0,1 | 1,0 |
| Гипофиз | 0,1 | 0,1 |
| Надпочечники | 0,9 | 4,1 |
| Половые железы | 1,3 | 1,9 |
| ФМСФ-ингибируемая карбоксипептидаза | Гипоталамус | 0,1 | 0,8 |
| Гипофиз | 1,3 | 1,5 |
| Надпочечники | 1,1 | 0,8 |
| Половые железы | 4,1 | 4,5\* |

Примечание. Звездочкой показана достоверность критерия Фишера: \* – p<0,05.

У самцов (таблица 4.1) не обнаружено статистически достоверных отличий между влиянием тестостерона и прогестерона. У самок (таблица 4.1) влияние вида гормона на активность ФМСФ-ингибируемой КП выявлено только в яичниках. Изменения активности КП Н не зависело от вида гормона. Возможно, это связано с тем, что у самцов, по-видимому, большая часть экзогенного прогестерона превращается в тестостерон и таким образом оказывает свое влияние. В то же время, у самок влияние прогестерона, вероятно, в меньшей степени обусловлено превращением в тестостерон. Половые железы, как основные источники половых стероидных гормонов, по-видимому, одними из первых подвержены действию экзогенных стероидов.

Изложенное выше, а также то, что активность ФМСФ-ингибируемой КП в половых железах значительно превосходит активность КП Н, объясняет наличие достоверного влияния вида вводимого стероидного гормона на активность исследуемого фермента только в яичниках.

У самок влияние тестостерона и прогестерона на активность КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП более выраженное, чем у самцов. Принимая во внимание факт, что у самок активность обоих ферментов выше, чем у самцов, можно сделать предположение: подобные различия связаны с особенностями функционирования ГГГС и ГГНС у самцов и самок [2, 40, 55].

Pekary A.E. и соавт. обнаружили, что диета, обедненная цинком (6 мкг цинка на 1 г диеты против 36 мкг цинка на 1 г диеты у контрольных крыс) способствует снижению активности КП Н в репродуктивных органах [224]. При этом уменьшается концентрация тиреотропин-рилизинг-фактора (ТРФ) в эпидидимусе и семенниках. Экзогенный тестостерон увеличивает концентрацию ТРФ у животных, в рационе которых был недостаток цинка [224]. В наших исследованиях обнаружено, что через 4 ч после введения тестостерона в семенниках происходило увеличение активности КП Н. Не исключено, что данный эффект тестостерона может опосредоваться ТРФ.

В гипоталамусе самок обнаружено снижение активности ФМСФ-ингибируемой КП через 4 и 24 ч и активности КП Н через 24 ч после введения как тестостерона, так и прогестерона. Известно, что тестостерон в некоторой степени ингибирует секрецию аргинин-вазопрессина из паравентрикулярного и супраоптического ядер гипоталамуса [175]. Имеются сведения о том, что гонадотропин-рилизинг-фактор (ГнРФ) синтезируется в виде высокомолекулярного предшественника – препрогонадотропин-рилизинг-фактора (препроГнРФ) [32]. Последний состоит из сигнального пептида (23 аминокислотных остатка), ГнРФ (10 аминокислотных остатка), остатка глицина, сайта процессинга из двух аминокислотных остатка – Lys-Arg и гонадолиберин-ассоциированного пептида (56 аминокислотных остатка). В ходе посттрансляционной модификации происходит отщепление сигнального пептида, а также разделение ГнРФ и гонадолиберин-ассоциированного пептида в сайте процессинга. Субстратная специфичность обеих исследуемых карбоксипептидаз позволяет предположить их участие в процессинге препроГнРФ. Поскольку эгзогенные тестостерон и прогестерон по механизму отрицательной обратной связи снижают синтез и секрецию ГнРФ [24, 27, 32, 39], то снижение активности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП в гипоталамусе самок может являться одним из способов реализации обратной связи между уровнями половых стероидов и ГнРФ.

Известно, что действие половых стероидов на многие внутриклеточные процессы обусловлены изменением экспрессии генов ключевых белков (ферментов). Поэтому модуляция активности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП, наблюдаемая при введении тестостерона или прогестерона, вероятно, связана с влиянием этих половых стероидов на уровень экспрессии генов исследуемых карбоксипептидаз. Возможно, поэтому влияние тестостерона и прогестерона на активность КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП более выражено через 24 ч.

Наиболее сильное влияние обоих половых стероидов на активность КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП у животных обоего пола наблюдалось в гипофизе и половых железах. Последние являются местом синтеза и основным объектом воздействия половых гормонов. В гипофизе синтезируются ЛГ и ФСГ – гормоны, ответственные за синтез и секрецию как тестостерона, так и прогестерона. Повышение уровня тестостерона и прогестерона в крови при парентеральном введении, по-видимому, в первую очередь затрагивает гипофиз и половые железы. Есть данные об участии прогестерона в контроле тонической секреции гонадотропинов у самок [40]. Krey L.C. и соавт. обнаружили, что в присутствии прогестерона секреция ФСГ клетками гипофиза in vitro изменялась следующим образом: возрастала до 6 ч, оставалась на этом уровне через 9 ч и снижалась через 24 ч [168]. Таким образом, изменение активности исследуемых карбоксипептидаз у самок мышей согласуется с изменением секреции ФСГ в присутствии прогестерона. Возможно, что изменение активности исследуемых карбоксипептидаз, которые участвуют в процессинге предшественников гонадотропных гормонов гипофиза, является одним из механизмов снижения синтеза и секреции ЛГ и ФСГ половыми стероидами.

Не исключено, что обе основные карбоксипептидазы могут участвовать в ответе гипофиза и гонад на избыток половых стероидов в крови. Исходя из распределения исследуемых ферментов в ГГНГС мышей, можно предположить, что в гипофизе эту функцию преимущественно выполняет КП Н, а в половых железах – ФМСФ-ингибируемая КП. Таким образом, изменение активности исследуемых карбоксипептидаз через пептидергические системы может влиять на уровень стероидных гормонов в плазме крови, а через эти гормоны – на функционирование других систем организма.

Влияние тестостерона и прогестерона на активность КП Н в гипофизе самок отличается от такового у самцов через 0,5 и 4 ч после введения: у самок активность повышалась, у самцов – снижалась. При этом через 24 ч после инъекции тестостерона или прогестерона достоверных отличий в изменении активности КП Н в гипофизе не обнаружено. Активность ФМСФ-ингибируемой КП через 24 ч после введения тестостерона в гипофизе самцов отличалась от такового у самок.

Таким образом можно предположить, что влияние тестостерона и прогестерона на активность исследуемых карбоксипептидаз зависит от пола животного. Это предположение подтверждается результатами дисперсионного анализа влияния пола животного и времени после введения на активность КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП (таблица 4.2).

Пол животного и время после введения влияют на активность как КП Н, так и ФМСФ-ингибируемой КП во всех отделах ГГНГС мышей, за исключением активности КП Н в гипоталамусе. Достоверной зависимости активности КП Н в надпочечниках и половых железах от взаимодействия пола животного и времени после введения тестостерона или прогестерона не обнаружено. Активность ФМСФ-ингибируемой КП во всех случаях достоверно зависела от пола и взаимодействия пола и времени после инъекции.

Все вышеизложенное позволяет предположить, что ФМСФ-ингибируемая КП в большей степени, чем КП Н, ответственна за отличия в функционировании ГГНГС и пептидергических систем у самцов и самок.

Известно, что в тканях самцов и самок половые стероиды метаболизируются по-разному [94]. Кроме того, период полураспада экзогенного тестостерона составляет 40-100 мин [42, 192]. Следовательно, к 24 ч различия в действии данного полового стероида на активность ФМСФ-ингибируемой КП у самцов и самок могут быть обусловлены разными продуктами метаболизма тестостерона у животных разного пола.

Известно, что содержание лептина – полипептидного гормона, который экспрессируется в адипоцитах, – у женщин больше, чем у мужчин [226]. Тестостерон in vitro не влияет на секрецию лептина. Но инкубация женской жировой ткани с ДГТ вызывает уменьшение уровня лептина [226]. Возможно, что уменьшение активности ФМСФ-ингибируемой КП во всех отделах ГГНГС самок мышей через 24 ч после введения тестостерона опосредовано ДГТ.

Многие биохимические, физиологические и поведенческие процессы регулируются тестостероном посредством его превращения в эстрогены (через ароматазу) [60, 156, 166, 233]. Тестостерон стимулирует продукцию цАМФ [244]. В ряде исследований показано, что цАМФ увеличивает как активность ароматазы, так и уровень мРНК данного фермента [111]. Подобным образом экзогенный тестостерон способен регулировать уровень эстрогенов в мозге самцов. Не исключено, что во влиянии тестостерона на активность исследуемых карбоксипептидаз могут быть задействованы цАМФ-зависимые механизмы.

Таблица 4.2. Значения критерия Фишера, характеризующие влияние пола животного и взаимодействия пола и времени после введения тестостерона или прогестерона на активность основных карбоксипептидаз в ГГНГС мышей.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| Экзогенный гормон | Фермент | Отдел ГГНГС | Fф1 | Fф2 |
| Тестостерон | Карбоксипеп-тидаза Н | Гипоталамус | 3,1 | 2,3 |
| Гипофиз | 10,5\*\* | 1,8 |
| Надпочечники | 11,4\*\* | 2,4 |
| Половые железы | 8,8\*\* | 0,3 |
| ФМСФ-ингибируемая КП | Гипоталамус | 28,7\*\*\* | 17,0\*\*\* |
| Гипофиз | 28,4\*\*\* | 6,3\*\* |
| Надпочечники | 5,5\* | 4,3\* |
| Половые железы | 71,2\*\*\* | 10,6\*\*\* |
| Прогестерон | Карбоксипеп-тидаза Н | Гипоталамус | 3,8 | 3,9\* |
| Гипофиз | 27,3\*\*\* | 4,2\* |
| Надпочечники | 24,0\*\*\* | 2,3 |
| Половые железы | 12,6\*\* | 2,8 |
| ФМСФ-ингибируемая КП | Гипоталамус | 23,7\*\*\* | 10,6\*\*\* |
| Гипофиз | 61,6\*\*\* | 12,5\*\*\* |
| Надпочечники | 6,1\* | 7,3\*\* |
| Половые железы | 183,3\*\*\* | 33,3\*\*\* |

Примечание. Fф1, Fф2, – значения критерия Фишера характеризующие влияние, соответственно, пола животного и взаимодействия пола и времени после введения половых стероидных гормонов; звездочками показана достоверность критерия Фишера: \* – p<0,05, \*\* – p<0,01, \*\*\* – p<0,001.

Интересно, что у самок, в случае наличия достоверных изменений, как тестостерон, так и прогестерон, практически во всех отделах ГГНГС, и во все изученные временные интервалы снижал активность ФМСФ-ингибируемой КП, то у самцов, наоборот, – повышал. Известно, что животные разного пола различаются по содержанию нейропептидов в мозге [2, 38, 40, 54, 82, 96, 138]. Кроме того, активность ферментов, вовлекающихся в обмен нейропептидов и половых стероидных гормонов, различна у самцов и самок [124, 125]. В частности, уровень ароматазной активности в некоторых зонах мозга больше у самцов, чем у самок [233]. Поэтому, возможно, ФМСФ-ингибируемая КП по-разному функционирует у самцов и самок и/или вовлекается в разные процессы, связанные с ответом на избыток половых стероидов в крови. Помимо этого, имеются сведения об активирующем влиянии прогестерона на продукцию цАМФ и цГМФ, а также тестостерона – на продукцию цАМФ в яичниках свиньи [244]. цАМФ способствует высвобождению содержимого секреторных везикул [65]. Поэтому не исключено, что увеличение активности ФМСФ-ингибируемой КП в семенниках через 0,5 и 4 ч и в надпочечниках через 0,5 ч после введения прогестерона обусловлено увеличением секреции цГМФ.

Известно, что активность цистиновой аминопептидазы в плазме модулируется прогестероном как у самок мышей, так и у самцов, а также андрогеном у самцов [191]. Максимальная активность цистиновой аминопептидазы обнаружена на 13 день беременности. Таким образом обнаружено, что андрогены по-разному влияют на активность цистиновой аминопептидазы у самок и самцов. Причем у последних активность фермента минимальна. Это согласуется с нашими результатами по влиянию тестостерона и прогестерона на активность КП Н в гипофизе.

Известно, что прогестерон способствует открытию ионных каналов в плазматической мембране и стимулирует фосфорилирование остатков тирозина в белках [190]. Тестостерон и прогестерон участвуют в регуляции внутриклеточной концентрации Ca2+ [109, 252]. Ионы Ca2+ влияют на выброс секреторных везикул [65, 59]. Несмотря на то, что ионы Ca2+ непосредственно не влияют на активность КП Н [98, 211], в ее составе обнаружен участок связывания данных ионов. Ионы Ca2+ способствуют агрегации КП Н и связыванию ее с мембраной [255]. Возможно, что биологическая роль растворимой и мембраносвязанной КП Н отличается [5, 7, 10]. Предполагают, что обе формы участвуют в процессинге, но мембраносвязанная, наряду с этим, способна принимать участие в сортировке пептидов [83, 84, 159, 216, 217, 240]. Кроме того имеются сведения о том, что активность прогормон-конвертазы – фермента, участвующего в процессинге проКП Н, регулируется ионами Ca2+ [116]. Изложенное выше позволяет предположить, что действие тестостерона и прогестерона на активность КП Н может быть опосредовано изменениями внутриклеточной концентрацией ионов Ca2+. Это может приводить как к изменению уровня активности фермента, так и к изменению соотношения растворимой и мембраносвязанной форм, что в свою очередь влияет на процессинг и сортировку биологически активных пептидов.

Имеются сведения о том, что яичники секретируют пролактин-подобный пептид, при этом прогестерон является возможным ингибитором данного процесса [245]. Снижение активности ФМСФ-ингибируемой КП в яичниках через 24 ч после введения прогестерона, возможно, способствует снижению синтеза и/или секреции пролактин-подобного пептида.

Кроме того известно, что прогестерон может влиять на уровень мРНК окситоцина в паравентрикулярном ядре гипоталамуса (а также на многие другие физиологические процессы) путем модуляции рецепторов ГАМК или путем прямого изменения транскрипции гена через рецепторы прогестерона [171, 267, 280]. ГАМК участвует в регуляции секреции многих аденогипофизарных гормонов. ГАМК и ее рецепторы могут принимать участие в секреции ЛГ. Известно, что увеличение уровня ГАМК в организме сопровождается угнетением, а его снижение – усилением компенсаторного повешения уровня тестостерона в периферической крови после односторонней кастрации. Таким образом ГАМКергические механизмы способны принимать участие в регуляции функции ГГГС механизмом отрицательной обратной связи. Имеются данные об изменении активности КП Н при введении ГОМК [9]. Другими словами, влияние прогестерона на активность КП Н может, вероятно, опосредоваться также и ГАМК-ергической системой.

В опытах in vitro тестостерон и прогестерон не влияли на активность КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП. Стероиды, такие как глюкокортикоиды, андрогены и прогестины, влияют на уровень экспрессии генов. Известно, что глюкокортикоиды влияют на уровень экспрессии мРНК КП Н [155, 186, 232]. В частности, дексаметазон снижает уровень мРНК КП Н в клетках AtT-20 [232]. Поэтому можно предположить, что действие тестостерона и прогестерона на активность КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП обусловлено изменением уровня экспрессии соответствующих генов. Кроме того, в результате наших исследований обнаружено, что наиболее сильные изменения активности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП в ГГНГС мышей происходили через 24 ч после введения половых стероидов. Это является косвенным подтверждением предполагаемого механизма действия тестостерона и прогестерона на активность исследуемых карбоксипептидаз.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что активность КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП регулируется уровнем половых стероидных гормонов в организме. При этом КП Н и ФМСФ-ингибируемая КП, вероятно, участвуют в регуляции уровня ГнРФ, ЛГ, ФСГ и других биологически активных пептидов, контролирующих уровень стероидных гормонов. В то же время исследуемые карбоксипептидазы, возможно, вовлекаются в регуляцию уровня ГнРФ, ЛГ, ФСГ половыми стероидными гормонами. Можно предположить, что КП Н и ФМСФ-ингибируемая КП, посредством изменения уровня нейропептидов, регулирующих содержание половых стероидных гормонов в организме, участвуют в формировании полового диморфизма, функционирования пептидергических и других нейромедиаторных систем, а также вовлекаются в контроль процессов половой дифференциации и размножения.

**ВЫВОДЫ**

В гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадной системе мышей наиболее высокая активность карбоксипептидазы Н обнаружена в гипофизе и гипоталамусе, а активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы – в половых железах и надпочечниках. Активность исследуемых ферментов зависела от пола животных: у самок во всех отделах гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадной системе активность карбоксипептидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы была выше, чем у самцов.

Обнаружено, что в гипоталамо-гипофизарно-надпочечниково-гонадной системе мышей экзогенные тестостерон и прогестерон вызывали, в основном, снижение активности карбоксипептидазы Н и ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы. Изменение активности исследуемых ферментов при введении половых стероидных гормонов зависели от пола животного и времени после инъекции и, практически, не зависели от дозы вводимого гормона.

Наиболее существенное изменение активности КП Н и ФМСФ-ингибируемой КП при введении тестостерона и прогестерона выявлено в гипофизе и половых железах у животных обоего пола. Минимальное влияние половых стероидных гормонов на активность ферментов обнаружено в гипоталамусе.

Обнаружено, что вид экзогенного полового гормона достоверно влиял только на активность ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы в яичниках мышей.

Активность исселедуемых карбоксипептидаз не изменялась in vitro при действии тестостерона и прогестерона.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Ашмарин И.П., Каразеева Е.П. Нейропептиды // в кн. “Нейрохимия” под ред. Ашмарина И.П., Стукалова П.В.- М.: Издательство института биомедицинской химии РАМН.-1996.- С.296-333.
2. Бабичев В.Н. Нейроэндокринный контроль процессов пубертации // Усп. совр. биол. – 1994. – 114, № 3. – С. 330-344.
3. Бабичев В.Н., Миронов С.Ф. Нейропептиды мозга и их нейроэндокринные эффекты // Пробл. эндокринол. – 1981. – № 3. – С. 78-85.
4. Бэйрд Д.Т. Яичник / Гормональная регуляция размножения у млекопитающих. – М.: Мир. – 1987. – С. 118-144.
5. Вернигора А.Н., Генгин М.Т. Механизм регуляции активности и биологическая роль карбоксипептидазы H – фермента процессинга нейропептидов // Биохимия - 1995. - 60, № 12. - С. 1491-1497.
6. Вернигора А.Н., Генгин М.Т. Протеолитические ферменты: субклеточная локализация, свойства и участие в обмене нейропептидов // Биохимия. – 1996. - 61, № 5. - С. 771-785.
7. Вернигора А.Н., Генгин М.Т., Никишин Н.Н. Множественность молекулярных форм растворимых карбоксипептидазо-В-подобных ферментов головного мозга кошки // Укр. биохим. журн. – 1993.– 65, № 4. – С. 17-21.
8. Вернигора А.Н., Генгин М.Т., Салдаев Д.А., Щетинина Н.В. Распределение активности фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы в нервной ткани котов // Нейрохимия – 1997. – 14, № 4.
9. Вернигора А.Н., Генгин М.Т., Щетинина Н.В., Спиридонов Д.А. Влияние гидроксибутирата натрия на активность карбоксипептидазы Н и ангиотензинпревращающего фермента в различных отделах мозга крыс // Укр. биохим. журн.– 1999. – 71, № 2.– С. 91-92.
10. Вернигора А.Н., Никишин Н.Н., Генгин М.Т. Влияние глюкортикоидов на активность растворимой и мембраносвязанной форм карбоксипептидазы Н in vivo // Укр. биохим. журн. – 1995. – 67, № 6. – С. 93-98.
11. Вернигора А.Н., Никишин Н.Н., Генгин М.Т. Частичная характеристика фенилметилсульфонилфторид-ингибируемой карбоксипептидазы из головного мозга кошки // Биохимия. – 1995. – 60, № 11. – с. 1860-1866.
12. Вернигора А.Н., Щетинина Н.В., Генгин М.Т. Исследование активности основных (отщепляющих остатки аргинина и лизина) карбоксипептидаз у крыс разного возраста // Биохимия. – 1996.– 61, № 10.– С. 1848-1856.
13. Вернигора А.Н., Щетинина Н.В., Генгин М.Т. Распределение активности ФМСФ-ингибируемой карбоксипептидазы в тканях и отделах головного мозга ежа европейского (Erinaceus europaeus) // Укр. биохим. журн. – 1996. – 68, № 5. – С. 118-121.
14. Генгин М.Т. Новая КП нервной ткани. Региональное распределение и некоторые физико-химические свойства // Нервная система. – Л. – ЛГУ. – 1991.- С. 29-30.
15. Генгин М.Т., Вернигора А.Н. Влияние этанола на активность карбоксипептидазы Н в мозге крыс. // Укр.биохим.журн. – 1993. – т. 65. – №1. – С. 100-103.
16. Генгин М.Т., Вернигора А.Н. Ферменты процессинга опиоидных пептидов и методы определения их активности // Укр. биохим. журн. – 1994. – т.66. - №2. – С.3-17.
17. Генгин М.Т., Вернигора А.Н., Никишин Н.Н. Влияние эмоционально-болевого стресса на активность КПН - фермента процессинга нейропептидов головного мозга крыс // Физиол. ж. – 1994.– 80.-№3.– С.23-27.
18. Генгин М.Т., Вернигора А.Н., Никишин Н.Н., Керимов В.Ю. Эффект эмоционального стресса на активность карбоксипептидазы Н в отделах головного мозга крыс с различной к нему устойчивостью // Вопр. мед. химии.– 1995.– т.41, №4.– С.8-9.
19. Гомазков О.А. Мозг и нейропептиды // Справочно-информационное издание.- М.-1997.
20. Гомазков О.А. Физиологически активные пептиды. – М.: Изд-во Инст. Биомед. Химии РАМН, 1995.– 143 с.
21. Гомазков О.А. Функциональная биохимия регуляторных пептидов.– М.: Наука. 1993, 160 с.
22. Гомазков О.А., Григорьянц О.О. Регуляция биосинтеза энкефалинов: биохимические и физиологические аспекты // Успехи совр. биол. – 1989. – 108, № 1(4). – С. 109-124.
23. Гончаров Н.П., Андрогены (лекция) // Пробл. эндокрин. – 1996. – 42, № 4. – С. 28-31.
24. Гормонотерапия: Пер. с нем. / Под ред. Шамбаха Х., Кнаппе Г., Карола В. – М.: Медицина, 1988, 416 с.
25. Григорьянц О.О., Гомазков О.А. Энкефалинобразующие ферменты // Вопр. мед. химии.– 1986.– 32, № 3.– С. 15-20.
26. Дмитриев А.Д. Биосинтез нейропептидов // Итоги науки и техники ВИНИТИ. Фармакол. химиотерапевт. средства. – 1982. – 43. – С. 7-49.
27. Држевецкая И.А. Основы физиологии обмена веществ и эндокринной системы. – М.: Высш. шк., 1994, 256 с.: ил.
28. Замятнин А.А. Общие функциональные особенности зндогенных регуляторных олигопептидов // Физиол. ж. – 1992. – 78, № 9. – С. 39-49.
29. Зезеров Е.Г., Северин Е.С. “Простатические” калликреины, половые гормоны, инсулиноподобные факторы роста – комплекс регуляторных элементов у мужчин и женщин при физиологческих процессах и канцерогенезе // Вест. Росс. Академ. Мед. Наук. – 1999. – № 3. – С. 49-56.
30. Корнева Е.А. Регуляторные пептиды как модуляторы защитных функций организма // Физиол. ж. – 1985. – 75, № 5. – С. 656-665.
31. Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высш. шк., 1990. – 352 с.
32. Марри Р., Греннер Д., Мейес П., Родуэлл В. Биохимия человека: В 2-х томах. Пер. с англ. / Под ред. Гинодмана Л.М. – М.: Мир, 1993.
33. Науменко Е.В., Жукова А.В., Серова Л.И. Участие гамма-аминомасляной кислоты в механизмах обратной связи гипоталамо-гипофизарно-семенникового комплекса // Пробл. эндокрин. – 1995. – 41, № 2. – С. 30-32.
34. Панченко Л.Ф. Возрастные особенности обновления белков различных отделов центральной нервной системы и печени // Физиол. ж. – 1958.– 44, № 3. - С. 243-248.
35. Панченко Л.Ф., Брусов О.С., Беляев Н.А. Исследование механизма действия этанола на активность энкефалиназы A мозга крыс // Бюлл. эксперим. биол. мед.– 1984.– 97, № 6.– С. 691-692.
36. Раевский К.С. Эндогенные опиоидные пептиды как возможные нейропередатчики // Итоги науки и техники ВИНИТИ. Фармакологические и химиотерапевтические средства. - 1982. - 43. - С. 185-200.
37. Степанов М.Г., Секретарева Е.В., Проймина Ф.И., Савченко О.Н. Отрицательная и положительная фазы реакции гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы самок крыс на введение половых гормонов // Физиол. ж. – 1991. – 77. – № 3. – С. 108-115.
38. Сухоруков В.С., Тарабрин С.Б. Роль пролактина в регуляции функций мужской гонады // Усп. совр. биол. – 1993. – 113, № 3. – С. 366-376.
39. Теппермен Дж., Теппермен У. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. Вводный курс: Пер. с англ. / Под ред. Ажипа Я.И. – М.: Мир, 1989, 656 с.
40. Тинников А.А. Роль гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы в регуляции полового развития // Усп. совр. биол. – 1990. – 110, № 3. – С. 419-430.
41. Ткачева Н.Ю. Влияние прогестерона на липидный состав плазмы крови и плазматических мембран клеток матки крыс // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 1993. – CXVI, № 11. – С. 518-520.
42. Физиология человека / Под ред. Косицкого Г.И. – М.: Медицина, 1985, 544 с., ил.
43. Хип Р., Флинт А. Беременность / Гормональная регуляция размножения у млекопитающих. – М.: Мир. – 1987. – С. 193-244.
44. Щетинина Н.В., Вернигора А.Н., Генгин М.Т. Активность основных карбоксипептидаз у крыс разного пола // Укр. биохим. журн. – 1997. –70, № 3. - С. 110-113.
45. Щетинина Н.В., Вернигора А.Н., Генгин М.Т., Фирстова Н.В. Тканевое и региональное распределение активности фенилметилсульфонилфторидинигибируемой карбоксипептидазы и других карбоксипептидаз у крыс // Укр. биохим. журн. – 1997. – 70, № 3. – С. 23-28.
46. Ahmad S., Ward P.E. Depressor action of bradykinin agonists relative to metabolism by angiotensin-converting enzyme, carboxypeptidase N, and aminopeptidase P // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1992. – 200, N 1. – P. 115-121.
47. Alankari A.R.S. Relationship between gonadal steroids and corticosterone during blood sampling in saker falcons // J. Wildlife Dis. – 1998. – 34, N 3. – P. 653-655.
48. Alcalde L., Tonacchera M., Costagliola S., Jaraquemada D., Pujol Borrell R., Ludgate M. Cloning of candidate autoantigen carboxypeptidase H from a human islet library: sequence identity with human brain CPH // J. Autoimmunity. – 1996. – 9, N 4. – P. 525-528.
49. Alvarez-Bolado G., Fairen A., Douglass J., Naranjo J.R. Expression of the prodynorphin gene in the developing and adult cerebral cortex of the rat: an in situ hybridization study // J. Comp. Neurol. – 1990. – 300, N 3. – P. 287-300.
50. Ambler R.P. Enzymic hydrolysis with carboxypeptidases // Meth. Enzymol. – New York, London: Acad. Press, 1967. – 11. – P. 155-166.
51. Ando Y., Watanabe H., Fujimoto N., Ito A., Toge T. Progesterone enhancement of stomach tumor development in SD rats treated with N methyl N' nitro N nitrosoguanidine // Jap. J. Canc. Res. – 1995. – 86, N 10. – P. 924-928.
52. Angstwurm M.W., Gartner R., Ziegler Heitbrock HW. Cyclic plasma IL 6 levels during normal menstrual cycle // Cytokine. – 1997. – 9, N 5. – P. 370-374.
53. Anic M., Mesaric M. The influence of sex steroid hormones on ganglioside biosynthesis in rat kidney // Biol. Chem. – 1998. – 379, N 6. – P. 693-697.
54. Arai Y., Matsumoto A., Nishizuka M. Synaptogenesis and neural plasticity to gonadal steroids // Cur. Top. Neuroendocrin. – 1986. – 7. – P. 291-307.
55. Arnold A.P., Gorski R.A. Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system // Annu. Rev. Neurosci.– 1984.– 7.– P. 413-442.
56. Arsenijevic Y., Tribollet E. Region specific effect of testosterone on oxytocin receptor binding in the brain of the aged rat // Brain Res. – 1998. – 785, N 1. – P. 167-170.
57. Azaryan A.V., Hook V.Y.H. Distinct properties of prohormone thiol protease (Ptp) compared to cathepsin B, cathepsin L, and cathepsin H - evidence for Ptp as a novel cysteine protease // Arch. Biochem. Biophys. – 1994. – 314, N 1. – P. 171-177.
58. Azaryan A.V., Hook V.Y.H. Unique cleavage specificity of prohormone thiol protease related to proenkephalin processing // FEBS Lett. – 1994. – 341, N 2-3. – P. 197-202.
59. Bader M.F., Simon J.P., Sontag J.M,. Langley K., Aunis D. Role of calcium in secretion and synthesis in bovine adrenal chromaffin cells // Adv. Exp. Med. Biol. – 1990. – 269. – P. 93-97.
60. Balthazart J., Ball G.F. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase) // Trends Neurosci. – 1998. – 21, N 6. – P. 243-249.
61. Baumann M.N., Rabii J. Inhibition of suckling-induced prolactin release by mu- and k-opioid antagonists // Brain Res. – 1991. – 567, N 2. – P. 224-230.
62. Bayon A., Shoemaker W.J., Bloom F.E., Mauss A., Guillemin R. Perinatal development of the endorphin and enkephalin-containing systems in the rat brain // Brain Res. – 1979. – 179. – P. 93-101.
63. Belsham D.D., Evangelou A., Roy D., Le D.V., Brown T.J. Regulation of gonadotropin releasing hormone (GnRH) gene expression by 5 alpha dihydrotestosterone in GnRH secreting Gt1 7 hypothalamic neurons // Endocrinology. – 1998. – 139, N 3. – P. 1108-1114.
64. Bingaman E.W., Magnuson D.J., Gray T.S., Handa R.J. Androgen inhibits the increases in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH) and CRH-immunoreactivity following gonadoectomy // Neuroendocrinology. – 1994. – 59, N 2. – P. 228—234.
65. Biologically active peptides: design, synthesis and utilization / W.V.Williams, D.B.Weiner, Eds. – Lancaster: Technomic, 1993. – 360 pp.
66. Birch N.P., Rodriguez C., Dixon J.E., Mezey E. Distribution of carboxypeptidase H messenger RNA in rat brain using in situ hybridization histochemistry: implications for neuropeptide biosynthesis // Brain Res. Mol. Brain Res. – 1990. – 7, N 1. – P. 53-59.
67. Bjorntorp P. Growth Hormone, Insulin Like Growth Factor I and Lipid Metabolism Interactions with Sex Steroids // Horm. Res. – 1996. – 46, N 4-5. – P. 188-191.
68. Bloom D.F., Bloch G.J., Gorski R.A. Effects of Thymectomy on Reproductive Function and Behavior // Physiol. Behav. – 1992. – 52, N 2. – P. 291-298.
69. Bokish V.A., Muller-Eberhard H.J. Anaphylotoxin inactivator in human plasma: its isolation and characterisation as a carboxypeptidase // J. Clin. Invest. – 1970. – 49. – P. 2427-2436.
70. Boman K., Strang P., Backstrom T., Stendahl U. The influence of progesterone and androgens on the growth of endometrial carcinoma // Cancer. – 1993. – 71, N 11. – P. 3565-3569.
71. Bommer M, Nikolarakis K, Noble E.P, Herz A. In vivo modulation of rat hypothalamic opioid peptide content by intracerebroventricular injection of guanidinoethylmercaptosuccinic acid (GEMSA) possible physiological role of enkephalin convertase // Brain Res. – 1989. – 492, N 1/2. – P. 305-313.
72. Bondy C.A., Whitnall M.H., Brady L.S. Regulation of carboxypeptidase H gene expression in magnocellular neurons: response to osmotic stimulation // Mol. Endocrinol. – 1989. – 3, N 12. – P. 2086-2092.
73. Bonten E.J, Galjart N.J, Willemsen R, Usmany M, Vlak JM, d'Azzo A. Lysosomal protective protein/cathepsin A. Role of the "linker" domain in catalytic activation // Biol Chem. – 1995. – 270. N 44. – P. 26441-26445.
74. Bradshaw R.A., Neurath H., Walsh K.A. Consideration of the concept of structural homology as applied to bovine carboxypeptidases A and B // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1969. – 263, N 2. – P. 406-411.
75. Brown T.J., MacLusky N.J., Shanabrough M., Naftolin F. Comparison of age and sex-related changes in cell nuclear estrogen-binding capasity and progestin receptor induction in the rat brain // Endocrinology. – 1990. – 126. – P. 2965—2972.
76. Campball W., Okada H. An arginine specific carboxypeptidase generated in blood during coagulation or inflamation which is unrelated to carboxypeptidase N or its subunits // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 162, N 3. – P. 933-939.
77. Campbell W., Yonezu K., Shinohara T., Okada H. An arginine carboxypeptidase generated during coagulation is diminished or absent in patients with rheumatoid arthritis // J. Lab. Clin. Med. – 1990. – 115, N 5. – P. 610-612.
78. Cardone A., Angelini F., Varriale B. Autoregulation of estrogen and androgen receptor messenger rnas and down regulation of androgen receptor messenger RNA by estrogen in primary cultures of Lizard testis cells // Gen. Comp. Endocrinol. – 1998. – 110, N 3. – P. 227-236.
79. Cassidenti D.L., Paulson R.J., Serafini P., Stanczyk F.Z., Lobo R.A. Effects of sex steroids on skin 5 alpha reductase activity in vitro // Obstetrics and gynecology. – 1991. – 78, N 1. – P. 103-107.
80. Charnning C.P., Andersen L.D., Hoover D.J. Hormonal control of granulosa cell secretion of oocyte maturation inhibitor and inhibin-F activity // Follicular maturation and ovulation: Exp. Med. Intern. Congr. Amsterdam. – 1982. – P. 219-236.
81. Chesselet M.F., Hook V.Y. Carboxypeptidase H-like immunoreactivity in the striatum of cats and monkeys // Regul. Pept. – 1988. – 20, N 2. – P. 151-159.
82. Chisari A., Carino M., Perone M., Gaillard R.C., Spinedi E. Sex and strain variability in the rat hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis function // J. Endocrinol. Invest. – 1995. – 18, N 1. – P. 25-33.
83. Cool D.R., Loh Y.P. Carboxypeptidase E is a sorting receptor for prohormones – binding and kinetic studies // Mol. Cell. Endocrinol. – 1998. – 139, N 1-2, P. 7-13.
84. Cool D.R., Normant E., Shen F.S., Chen H.C., Pannell L., Zhang Y., Loh Y.P. Carboxypeptidase E is a regulated secretory pathway sorting receptor: genetic obliteration leads to endocrine disorders in Cpe(Fat) mice // Cell. – 1997. – 88, N 1, P. 73-83.
85. Dakes M.J., Davis T.P. The ontogeny of enzymes involved in posttranslational processing and metabolism of neuropeptides // Dev. Brain Res. – 1994. – 80, N 1-2, P. 127-136.
86. Dar D.E., Zinder O. Short term effect of steroids on catecholamine secretion from bovine adrenal medulla chromaffin cells // Neuropharmacology. – 1997. – 36, N 11-12. – P. 1783-1788.
87. Das B., Sablan E.L., Kilbourne E.J., Fricker L.D. Regulation of carboxypeptidase E by membrane depolarization in PC12 pheochromocythoma cells: comparison with the mRNA’s encording other peptide and catecholamine’s biosynthetic enzymes // Neurochem. – 1992. – 59, N 6. – P. 2263-2270.
88. Dasilva J.A.P Colvillenash P., Spector T.D., Scott D.L., Willoughby D.A. Inflammation induced cartilage degradation in female rodents protective role of sex hormones // Arthritis and Rheumatism. – 1993. – 36, N 7. – P. 1007-1013.
89. Davidson H.W., Hutton J.C. The insulin-secretory-granule carboxypeptidase H: Purification and demonstration of involvement in proinsulin processing // Biochem. J. – 1987. – 245, N 2. – P. 575-582.
90. Dedavid M.L.R., Desterin A.F., Goldraij A. Influence of gonadic hormones on the rat submaxillary gland // Arch. Biochem. Biophys. – 1991. – 99, N 1. – P. 107-109.
91. Deddish P.A., Skidgel R.A., Kriho V.B., Li X.Y., Becker R.P., Erdos E.G. Carboxypeptidase M in Madin-Darby canine kidney cells. Evidence that carboxypeptidase M has a phosphatidylinositol glycan anchor // J. Biol. Chem. – 1990. – 265, N 25. – P. 15083-15089.
92. Delk A.S., Durie P.R., Fletcher T.S., Largman C. Radioimmunoassay of active pancreatic enzymes in sera from patients with acute pancreatitis. I. Active carboxypeptidase B // Clin. Chem. – 1985. – 31, N 8. – P. 1294-1230.
93. Demmer W., Brand K. Carboxypeptidase activity in synaptic vesicles isolated from striatum and cortex of calf brain // Arch. Biochem. Biophys. – 1985. – 239, N 2. – P. 375-378.
94. Denef C., De Moor P. Sexual differentiation of steroid metabolizing enzymes in the rat liver. Further studies on predetermination by testosterone at birth // Endocrinology. – 1972. – 91, N 2. – P. 374—384.
95. Devi L. Tissue distribution of a dynorphin-processing endopeptidase // Endocrinology. – 1993. – 132, N 3. – P. 1139-1144.
96. Dies-Guerra F.J., Bicknell R.J., Mansfield S. et.al. Effect of neonatal testosterone upon opioid receptors and the content of beta-endorphin, neuropeptide Y and neorotensin in the medialbasal areas in the rat brain // Brain Res. – 1987. – 44, N 2. – P. 225-230.
97. Dieudonne M.N., Pecquery R., Boumediene A., Leneveu M.C., Giudicelli Y. Androgen receptors in human preadipocytes and adipocytes regional specificities and regulation by sex steroids // Am. J. Physiol. Cell Physiol. – 1998. – 43, N 6. – P. C1645-C1652.
98. Dochetry K., Hutton J.C. Carboxypeptidase activity in the insulin secretory granule // FEBS Lett. – 1983. – 162, N 1. – P. 137-141.
99. Donesky B.W., Demoura M.D., Tedeschi C., Hurwitz A., Adashi E.Y., Payne D.W. Interleukin 1 beta inhibits steroidogenic bioactivity in cultured rat ovarian granulosa cells by stimulation of progesterone degradation and inhibition of estrogen formation // Biol. Reprod. – 1998. – 58, N 5. – P. 1108-1116.
100. Eipper B.A, Green C.B, Mains R.E. Expression of prohormone processing enzymes in neuroendocrine and non neuroendocrine cells // Monogr. Natl. Cancer. Inst. – 1992. – 13, P. 163-168.
101. Ekman F.W., Eriksson E., Back F.W. Neuropeptide in human CSF // Acta Neurol. Scand. – 1989. – 79, N 3. – P. 261-262.
102. Erdos E.G., Sloane E.M., Wohler I.M. Carboxypeptidase in blood and other fluids // Biochem. Pharmacol. – 1964. – 13. – P. 893-905.
103. Erdos E.G., Sloane S.M. An enzyme in human blood plasma that inactivates bradikinin and kallidin // Biochem. Pharmacol. – 1962. – 11. – P. 585-592.
104. Erdos E.G., Yang H.Y.T., Tagne L.L., Manning N. Carboxypeptidase in blood and other fluids. The esterase activity of the enzyme // Biochem. Pharmacol. – 1967. – 16. – P. 1287-1297.
105. Fan X., Nagle G.T. Molecular cloning of Aplysia neuronal cDNAs that encode carboxypeptidases related to mammalian prohormone processing enzymes // DNA Cell Biol. – 1996. – 15, N 11. – P.937-945.
106. Fenske M. Dissociation of Plasma and Urinary Steroid Values After Application of stressors, insulin, vasopressin, acth, or dexamethasone in the mongolian gerbil // Experim. Clin. Endocrinol. Diabetes. – 1996. – 104, N 6. – P. 441-446
107. Fiedorek F.T Jr, Parkinson D. Carboxypeptidase H processing and secretion in rat clonal beta cell lines // Endocrinology. – 1992. – 131, N 3. – P. 1054-1062
108. Folk J.F., Piez K.A., Carroll W.R., Gladner I.A. Carboxypeptidase B. Purification and characterization of the porcine enzyme // J. Biol. Chem. – 1960. – 235, N 8. – P. 2272-2277.
109. Fomin V.P., Cox B.E., Word R.A. Effect of progesterone on intracellular Ca2+ homeostasis in human myometrial smooth-muscle cells // American J. Phisiol. Cell. Phisiol. – 1999. – 45, N 2, P. C379-C385.
110. Forsberg J.G. Estrogen effects on lymphoid tissue in neonatal and adult female mice // Acta Anat (Basel) – 1995. – 153, N 1. – P. 20-30.
111. Freking F., Ramachandran B., Schlinger B.A. Regulation of aromatase, 5-alpha-reductase and 5-beta-reductase in primary-cell cultures of developing zebra finch telencephalon // J. Neurobiology – 1998. –36, N 1. – P. 30-40.
112. Fricker L.D. Activation and membrane binding of carboxypeptidase E // J. Cell. Biochem. – 1988. – 38. – P. 279-289.
113. Fricker L.D. Carboxypeptidase E // Ann. Rev. Physiol. – 1988. – 50. – P. 309-321.
114. Fricker L.D., Adelman J.P., Douglass J., Thompson R.C, von Strandmann R.P, Hutton J AD. Isolation and sequence analysis of cDNA for rat carboxypeptidase E [EC 3.4.17.10], a neuropeptide processing enzyme // Mol. Endocrinol. – 1989. – 3, N 4. – P. 666-673.
115. Fricker L.D., Das B., Angeletti R.H. Identification of the pH dependent membrane anchor of carboxypeptidase E (EC 3.4.17.10) // J. Biol. Chem. – 1990. – 265, N 5. – P. 2476-2282.
116. Fricker L.D., Devi L. Posttranslational processing of carboxypeptidase E, a neuropeptide processing enzyme, in AtT 20 cells and bovine pituitary secretory granules // J. Neurochem. – 1993. – 61, N 4. – P. 1404-1415.
117. Fricker L.D., Herbert E. Comparison of a carboxypeptidase E-like enzyme in human, bovine, mouse, Xenopus, shark and Aplysia neural tissue // Brain Res. – 1988. – 453, N 1-2. – P. 281-286.
118. Fricker L.D., Plummer T.H., Snyder S.H. Enkephalin convertase: potent, selective and irreversible inhibitors // Biochem. and Biophys. Res. Commun. – 1983. – 11, N 3. – P. 994-1000.
119. Fricker L.D., Reaves B.J., Das B., Dannies P.S. Comparison of the regulation of carboxypeptidase E and prolactin in GH4C1 cells, a rat pituitary cell line. // Neuroendocrinology. – 1990. – 51, N 6. – P. 658-663.
120. Fricker L.D., Snyder S.H. Enkephalin convertase: purification and charasterization of a specific enkephalin-synthesizing carboxypeptidase localized to adrenall chromaffin granules // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – 79. – P. 3886-3890.
121. Fricker L.D., Snyder S.H. Purification and characterization of enkephalin convertase, an enkephaline-synthesizing carboxypeptidase // J. Biol. Chem. – 1983. – 258, N 18. – P. 10950-10955.
122. Fricker L.D., Supattapone S., Snyder S.H. Enkephalin convertase: a specific enkephalin synthesing carboxypeptidase in adrenal chromaffin granules, brain and pituitary gland // Life Sci. – 1982. – 31. – P. 1841-1844.
123. Gainer H., Russel J.T., Loh Y.P. The enzymology and intracellular organization of peptide precursor processing: the secretory vesicle hypothesis // Neuroendocrinology. - 1985. – 40, N 1. – P. 171-184.1992. – 131, N 3. – P. 1054-1062.
124. Gandarias J.M., Irazusta J., Fernandez D., Silio M., Casis L. Membrane-bound pyroglutamyl-arylamidase activity during the first postnatal month in several rat brain areas // Int. J. Dev. Biol. – 1994. – 38, N 1. – P. 127-129.
125. Gandarias J.M., Ramirez M., Zulaica J., Casis L. Aminopeptidase (arylamidase) activity in discrete areas of the rat brain: sex differences // Horm. Metab. Res. – 1989. – 5, N 21. – P. 285-286.
126. Gareth W.R., Ferrier J.N., Yinglee T.J. et al. Peptides the limbic lobe and schisophrenia // Brain Res. – 1983. – 288. N 1. – P. 199-211.
127. Gerdin E., Rane A. N-Demethylation of ethylmorphine in pregnant and nonpregnant women and in men an evaluation of the effects of sex steroids // Brit. J. Clin. Pharmacol. – 1992. – 34, N 3. – P. 250-255.
128. Gerendai I. Modulation of testicular functions by testicular opioid peptides // J. Physiol. Pharmacol. – 1991. – 42, N 4. – P.427-437.
129. Giltay E.J., Hoogeveen E.K., Elbers J.M.H., Gooren L.J.G., Asscheman H., Stehouwer C.D.A. Effects of sex steroids on plasma total homocysteine levels a study in transsexual males and females // J. Clin. Endocrinol. Met. – 1998. – 83, N 2. – P. 550-553.
130. Greco L., Daly L., Kim S., Devi L. Dynorphin-processing endopeptidase in the rat anteriorpituitary lactotrophic cell-line, Gh4C1 // Neuroendocrinology. – 1992. – 55, N 3. – P. 351-356.
131. Grigoriants O., Devi L., Fricker L.D. Dopamine antagonist haloperidol increases carboxypeptidase E mRNA in rat neurointermediate pituitary but not in various other rat tissues // Mol. Brain Res. – 1993. – 19. – P. 161-164.
132. Grimwood B.G., Plummer T.H. Jr., Tarentino A.L. Carboxypeptidase H. A regulatory peptide-processing enzyme produced by human hepatoma Hep G2 cells // J. Tiolog. Chem. – 1989. – 264, N 26. – P. 15662-15667.
133. Guest P.C., Arden S.D., Rutherford N.G., Hutton J.C. The posttranslational processing and intracellular sorting of carboxypeptidase H in the islets of Langerhans // Mol. Cell. Endocrinol. – 1995. – 113, N 1, P. 99-108.
134. Guest P.C., Ravazzola M., Davidson H.W., Orci L., Hutton J.C. Molecular heterogeneity and cellular localization of carboxypeptidase H in the islets of Langerhans // Endocrinology. – 1991. – 129, N 2. – P. 734-740.
135. Guest P.C., Rhodes C.J., Hutton J.C. Regulation of the biosynthesis of insulin secretory granule proteins. Coordinate translational control is exerted on some, but not all, granule К. matrix constituents // Biochem. J. – 1989. – 257, N 2. – P. 431-437.
136. Guest P.C., Pipeleers D., Rossier J., Rhodes C.J., Hutton, J.C. Co-secretion of carboxypeptidase H and insulin from isolated rat islets of Langerhans // Biochem. J. – 1989. – 264, N 2. – P. 503-508.
137. Hamamdzic D., Duzic E., Sherlock J.D., Lanier S.M. Regulation of alpha (2) adrenergic receptor expression and signaling in pancreatic beta cells // Am. J. Physiol. Endocrinol. Met. – 1995. – 32, N 1. – P. E162-E171.
138. Hammer R.P.Jr. Mu-opiate receptor binding in the medial preoptic area is cyclical and sexually dimorphic // Brain Res. – 1990. – 515, N 1-2. – P.187-192.
139. Hanna W.L., Turbov J.M., Jackman H.L., Tan Fulong, Froelich C.J. Dominant chymotrypsin-like esterase activity in human lymphocyte granules is mediated by the serine carboxypeptidase called cathepsin A-like protective protein // Immunol. – 1994. – 153, N 10, P. 4663-4672.
140. Harmar A.J. Neuropeptides // Transmitter Mol. Brain. – 1987. – 1. – P. 17-26.
141. Hendriks D., Scharpe S., van Sande M., Lommaert M.P. A labile enzyme in fresh human serum interferes with the assay of carboxypeptidase N // Clin. Chem. – 1989. – 35, N 1. – P. 177.
142. Hendriks D., Scharpe S., van Sande M., Lommaert M.P. Characterisation of a carboxypeptidase in human serum distinct from carboxypeptidase N // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. – 1989. – 27. – P. 277-285.
143. Hendriks D., Soons J., Scharpe S., Wevers R., van Sande M., Holmquist B. Identification of the carboxypeptidase responsible for the post-synthetic modification of creatine kinase in human serum // Clin. Chim. Acta. – 1988. – 172, N 2-3. – P. 253-260.
144. Hendriks D., Wang W., Scharpe S., Lommaert M.P., van Sande M. Purification and characterization of a new arginine carboxypeptidase in human serum // Biochim. Biophys. Acta. – 1990. – 23, N 1034(1). – P. 86-92.
145. Herfeld S., Moller P. Effects of 17-alpha-methyltestosterone on sexually dimorphic characters in the weakly discharging electric fish, brienomyrus-niger (Gunther, 1866) (Mormyridae) – electric organ discharge, ventral body-wall indentation, and anal-fin ray bone expansion // Horm. Behav. – 1998. – 34, N 3. – P. 303-319.
146. Hook V.Y. Arginine and lysine product inhibition of bovine adrenomedullary carboxypeptidase H, a prohormone processing enzyme // Life Sci. – 1990. – 47, N 13. – P. 1135-1139.
147. Hook V.Y. Carboxypeptidase B-like activity for the processing of enkephalin precursors in the membrane component of bovine adrenomedullary chromaffin granules // Neuropeptides. – 1984. – 4, N 2. – P. 117-126.
148. Hook V.Y. Regulation of carboxypeptidase H by inhibitory and stimulatory mechanisms during neuropeptide precursor processing. [Review] // Cell. Mol. Neurobiol. – 1988. – 8, N 1. – P. 49-55.
149. Hook V.Y., Affolter H.U., Palkovits M. Carboxypeptidase H in the hypothalamo neurohypophysial system: evidence for processing and activation of a prohormone processing enzyme during axonal transport // J. Neurosci. – 1990. – 10, N 10. – P. 3219-3226.
150. Hook V.Y., LaGamma E.F. Product inhibition of carboxypeptidase H // J. Biol. Chem. – 1987. – 262, N 26. – P. 12583-12588.
151. Hook V.Y., Lee E.E. Two peptidases that convert 125J-Lys-Arg-(Met)-enkephalin and 125J-enkephalin-Arg6, respectively, to 125J-(Met)-enkephalin in bovine adrenal medullary chromaffin granules // FEBS Lett. – 1984. – 172, N 2. – P. 212-218.
152. Hook V.Y., Loh Y.P. Carboxypeptidase B-like convertasing enzyme activity in secretory granules of rat pituitary // Cell Biol. – 1984. – 81. – P. 2776-2780.
153. Hook V.Y., Mezey E., Fricker L.D., Pruss R.M., Siegel R.E., Brownstein M.J. Immunochemical characterization of carboxypeptidase B-like peptide-hormone-processing enzymes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – 82. – P. 4745-4749.
154. Hook V.Y.H., Affolter H.U. Identification of zymogen and mature forms of human carboxypeptidase H. A processing enzyme for the synthesis of peptide hormones // FEBS Lett. – 1988. – 238, N 2. – P. 338-342.
155. Hook V.Y.H., Eiden L.E. (Met)enkephalin and carboxypeptidase processing enzyme are co-released from chromaffin cells by cholinergic stimulation // Biochem. Biophys. Res. Commun. - 1985. –128. – P. 563-567.
156. Hutchison J.B. Gender-specific steroid metabolism in neural differentiation // Cell. Mole. Neurobiol. – 1997. – 17, N 6. – P. 603-626.
157. Hyder S.M., Murthy L., Stancel G.M. Progestin regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells // Canc. Res. – 1998. – 58, N 3. – P. 392-395.
158. Irminger J.C., Verchere C.B., Halban P.A. Carboxypeptidase E is not a sorting receptor for proinsulin // Mol. Biol. Cell. – 1997. – 8, N S, P. 1786-1786.
159. Irminger J.C., Verchere C.B., Meyer K., Halban P.A. Proinsulin targeting to the regulated pathway is not impaired in carboxypeptidase E deficient Cpe(Fat)/Cpe(Fat) mice // J. Biol. Chem. – 1997. – 272, N 44, P. 27532-27534.
160. Ishida H., Scicli A.G., Carretero O.A. Contributions of various rat plasma peptidases to kinin hydrolysis // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1989. – 251, N 3. – P. 817-820.
161. Ito Y., Misutani S., Kurauchi O., Kasugai M., Narita O., Tomoda Y. Purification and properties of microsomal carboxypeptidase N (kininase I) in human placenta // Enzyme. – 1989. – 42. – P. 8-14.
162. Iwai M., Kanzaki H., Fujimoto M., Kojima K., Hatayama H., Inoue T., Higuchi T., Nakayama H., Mori T., Fujita J. Regulation of sex steroid receptor gene expression by progesterone and testosterone in cultured human endometrial stromal cells // J. Clin. Endocrinol. Met. – 1995. – 80, N 2. – P. 450-454.
163. Jung Y.K., Kunczt C.J., Pearson R.K., Fricker L.D., Dixon J.E. Expression of the rat carboxypeptidase-E gene in neuroendocrine and nonneuroendocrine cell lines // Mol. Endocrinol. – 1992. – 6, N 12. – P. 2027-2037.
164. Jungtestas I., Baulieu E.E. Steroid hormone receptors and steroid action in rat glial cells of the central and peripheral nervous system // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 1998. – 65, N 1 6. – P. 243-251.
165. Juvvadi S., Fan X.M., Nagle G.T., Fricker L.D. Characterization of aplysia carboxypeptidase E // FEBS Lett. – 1997. – 408, N 2, P. 195-200.
166. Karolczak M., Kupers E., Beyer C. Developmental expression and regulation of aromatase reductase and 5 alpha reductase type I messenger RNA in the male and female mouse hypothalamus // J. Neuroendocrinol. – 1998. – 10, N 4. – P. 267-274.
167. Krakower G.R., Meier D.A., Kissebah A.H. Female sex hormones, perinatal, and peripubertal androgenization on hepatocyte insulin dynamics in rats // Am. J. Physiol. – 1993. – 264, N 3. – P. E342-E347.
168. Krey L.C., Padmanabhan V., Beitins I.Z. Progesterone modulation of gonadotropin secretion by dispersed rat pituitary cells in culture follicle stimulating hormone synthesis and release // Mol. Cell. Endocrinol. – 1993. – 91, N 1 2. – P. 13-20.
169. Krieger D.T. Brain peptides: what, where and why? // Science. – 1983. – 222, N 4627. – P. 975-985.
170. Lacourse K.A., Friishansen L., Rehfeld J.F., Samuelson L.C. Disturbed progastrin processing in carboxypeptidase E deficient fat mice // FEBS Lett. – 1997. – 416, N 1. – P. 45-50.
171. Lancel M., Faulhaber J., Holsboer F., Rupprecht R. The GABA (A) receptor antagonist picrotoxin attenuates most sleep changes induced by progesterone. // Psychopharmacology. – 1999. – 141, N 2, P. 213-219.
172. Laslop A., Tschernitz C. Effects of nerve growth factor on the biosynthesis of chromogranin A and B, secretogranin II and carboxypeptidase H in rat PC12 cells // Neuroscience. -1992. – 49, N 2. – P. 443-450.
173. Levin Y., Skidgel R., Erdos E. Isolation and characterization of the subunits of human plasma carboxypeptidase N (kininase I) // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1982. – 79. – P. 4618-4622.
174. Li Z.G., Danis V.A., Brooks P.M. Effect of gonadal steroids on the production of IL 1 and IL 6 by blood mononuclear cells in vitro // Clin. Experim. Rheumatol. – 1993. – 11, N 2. – P. 157-162.
175. Liu X., Wang C.A., Chen Y.Z. Nongenomic effect of glucocorticoid on the release of arginine vasopressin from hypothalamic slices in rats // Neuroendocrinology. – 1995. – 62, N 6. – P. 628-633.
176. Loh Y.P., Parish D.C., Tuteja R. Purification and charasterization of a paired basic residue-specific pro-opiomelanocortin converting enzyme from bovine pituitary intermediate lobe secretory vesicles // J. Biol. Chem. – 1985. – 260, N 12. – P. 7194-7205.
177. Loh Y.P., Birch N.P., Castro M.G. Pro-opiomelanocortin and pro-vasopressin converting enzyme in pituitary secretory vesicles // Biochimie. – 1988. – 70, N 1. – P. 11-16.
178. Loh Y.P., Snell C.R., Cool D.R. Receptor mediated targeting of hormones to secretory granules, role of carboxypeptidase E // Trends Endocrinol. Met. – 1997. – 8, N 4, P. 130-137.
179. Lowry O.H., Rosebrought N.J., Farr A.G., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. – 1951. – 193, N 1. – P. 265-275.
180. Lynch D.R., Braas K.M., Hutton J.C., Snyder S.H. Carboxypeptidase E (CPE) immunocytochemical localization in the rat central nervous system and pituitary gland // J. Neurosci. – 1990. – 10. – N 5. – P. 1592-1599.
181. Lynch D.R., Venable J.C., Snyder S.H. Enkephalin convertase in the heart: similar disposition to atrial natriuretic factor // Endocrinology. – 1988. – 122, N 6. – P. 2683-2691.
182. Lynch D.R., Venable J.C., Strittmatter S.M., Snyder S.H. Enkephalin convertase: charasterization and localization using [3H]guanidinoethylmercaptosuccinic acid // Biochimie. – 1988. – 70, N 1. – P. 57-64.
183. MacCumber M.W., Snyder S.H., Ross C.A. Carboxypeptidase E (enkephalin convertase): mRNA distribution in rat brain by in situ hybridization // J. Neurosci. – 1990. – 10, N 8. – P. 2850-2860.
184. Mackin R.B., Spiess J., Goodman R.H, Noe B.D. Primary structure and tissue distribution of anglerfish carboxypeptidase H. // Mol. Cell Endocrinol. – 1991. – 78, N 3. – P. 171-178.
185. Mackin, R.B., Noe, B.D. Charasterization of an islet carboxypeptidase B involved in prohormone processing // Endocrinology. – 1987. – 120, N 2. – P. 457-468.
186. Mains R.E., Eipper B.A. Secretion and regulation of two biosyntetic enzyme activities, peptidyl-glycine α-amidating monooxygenase and a carboxypeptidase, by mouse pituitary corticotropic tumor cells // Endocrinology. – 1984. – 115, N 5. – P. 1683-1690.
187. Manser E., Fernandez D., Loo L., Goh P.Y., Monfries C., Hall C., Lim L. Human carboxypeptidase E., Isolation and characterization of the cDNA, sequence conservation, expression and processing in vitro // Biochem. J. 1990. – 267, N 2. – P. 517-525.
188. Marks N., Berg N., Benuck M., Lo E. –S., Novachenko H., Seyfried C. Prodynorphin processing by rat CNS fractions and purified enzyme: formation of dynorphin A 1-8 by sulfhydryl activated carboxypeptidase and peptidyl dipeptidase // Neurochem. Intern. – 1987. – 10, N 4. – P. 413-422.
189. Marks N., Grynbaum A., Benuck M. On the sequential cleavage of myelin basic protein by cathepsin A and D // J. Neurochem. – 1976. – 27. – P. 765-768.
190. Martinez F., Tesarik J., Martin C.M., Soler A., Mendoza C. Stimulation of tyrosine phosphorylation by progesterone and its 11-oh derivatives - dissection of a Ca2+-dependent and a Ca2+-independent mechanism // Biochem. Biophis. Res. Comm. – 1999. – 255, N 1. – P. 23-27.
191. Matsumoto H., Mori T. Changes in cystine aminopeptidase (oxytocinase) activity in mouse serum, placenta, uterus and liver duringpregnancy or after steroid hormone treatments // Zool. Sci. – 1998. – 15, N 1. – P. 111-115.
192. Mazer N.A. Mimicking the circadian pattern of testosterone and metabolite levels with an enhanced transdermal delivery system // Gurney, Junjinger, Peppas, eds. Pulsatile Drug Delivery: Current Applications and Future Trends. Stuttgart: Wiss. Veri. –Ges. – 1993. – P. 73-97.
193. Mcabee M.D., Doncarlos L.L. Ontogeny of region specific sex differences in androgen receptor messenger ribonucleic acid expression in the rat forebrain // Endocrinology. – 1998. – 139, N 4. – P. 1738-1745.
194. McDonald J.K., Schwabe C. Intracellularexopeptidase // Proteinases in mammalian cells and tissues / Barrett A.J. (ed.). Amsterdam: Elsevier/North Holland Biomedical Press, 1977. – p. 311-391.
195. McKay T.Y., Phelan A.W., Plummer T.H.Jr. Comparative studies on human carboxypeptidases B and N // Arch. Biochem. Biophys. –1979. – 197. – P. 487-492.
196. McKay T.Y., Plummer T.H.Jr. By product-analogues for bovine carboxypeptidase B // Biochemistry. – 1978. – 17. – P. 401-405.
197. McMillian M.K., Hudson P.M., Lee D.Y., Thai L., Hung G.H., Hong J.S. Developmental changes in rat adrenal enkephalin precursor: peptide ratio // Brain Res. Dev. Brain. Res. – 1993. – 71, N 1. – P. 75-80.
198. Melcangi R.C., Froelichsthal P., Martini L., Vescovi A.L. Steroid metabolizing enzymes in pluripotential progenitor central nervous system cells effect of differentiation and maturation // Neuroscience. – 1996. – 72, N 2. – P. 467-475.
199. Melcangi R.C., Maggi R., Martini L. Testosterone and progesterone metabolism in the human neuroblastoma cell-line SH-SY5Y // J. Steroid Biochem.Mol. Biol. – 1993. – 46, N 6. – P. 811—818.
200. Melcangi R.C., Magnaghi V., Cavarretta I., Riva M.A., Martini L. Corticosteroid effects on gene expression of myelin basic protein in oligodendrocytes and of glial fibrillary acidic protein in type 1 astrocytes // J. Neuroendocrinol. – 1997. – 9, N 10. – P. 729-733.
201. Melcangi R.C., Poletti A., Cavarretta I., Celotti F., Colciago A., Magnaghi V., Motta M., Negricesi P., Martini L. The 5 alpha reductase in the central nervous system expression and modes of control // J.Steroid Biochem.Mol. Biol. – 1998. – 65, N 1 6. – P. 295-299.
202. Melrose P., Gross L. Steroid effects on the secretory modalities of gonadotropin-releasing hormone release // Endocrinology. 1987. – 121, N 1. – P. 190—199.
203. Meunier J.C. The opioid peptides and their receptors // Biochem. – 1986. – 68, N 10-11. – P. 1153-1158.
204. Miller L., Hunt J.S. Sex steroid hormones and macrophage function // Life Sciences. – 1996. – 59, N 1. – P. 1-14.
205. Misao R., Itoh N., Mori H., Fujimoto J., Tamaya T. Sex hormone binding globulin mRNA levels in human uterine endometrium // Europ. J. Endocrinol. – 1994. – 131, N 6. – P. 623-629.
206. Mitra A., Song L.X., Fricker L.D. The C-terminal region of carboxypeptidase E is involved in membrane-binding and intracellular routing in AtT-20 cells // J. Biol. Chem. – 1994. – 269, N 31. – P. 19876-19881.
207. Morley J.E. Neuropipdes, behavior and aging // J. Amer. Geriatr. Soc. – 1986. – 34, N 1. – P. 52-62.
208. Moussaoui S., Duval P., Lenoir V., Garret C., Kerdelhue B . CGRP in the trigeminal nucleus, spinal cord and hypothalamus – effect of gonadal steroids // Neuropeptides. – 1996. – 30, N 6. – P. 546-550.
209. Nagae A., Deddish P.A., Becker R.P., Anderson C.H., Abe M., Tan F., Skidgel R.A., Erdos E.G. Carboxypeptidase M in brain and peripheral nerves // J. Neurochem. – 1992. – 59, N 6. – P. 2201-2212.
210. Naggert J.K., Fricker L.D., Varlamov O., Nishina P.M., Rouille Y., Steiner D.F., Carroll R.J., Paigen B.J., Leiter E.H. Hyperproinsulinaemia in obese fat/fat mice associated with a carboxypeptidase E mutation which reduces enzyme activity // Nature Genetics. – 1995. – 10, N 2. – P. 135-42.
211. Nalamachu S.R., Song L.X., Fricker L.D. Regulation of carboxypeptidase E – effect of Ca2+ on enzyme-activity and stability // J. Biol. Chem. – 1994. – 269, N 15. – P. 11192-11195.
212. Neurath H. Carboxypeptidases A and B // Enzymes. – New York, London: Acad Press, 1960. – N 4. – P. 11-36.
213. Nevalainen M.T., Valve E.M., Ahonen T., Yagi A., Paranko J., Harkonen P.L. Androgen dependent expression of prolactin in rat prostate epithelium in vivo and in organ culture // FASEB Journal. – 1997. – 11, N 14. – P. 1297-1307.
214. Nitray J., Sirotkin A., Poltarsky J. Progesterone and testosterone production in granulosa cells of sow ovaries after invitro nonapeptide hormone administration // Veterinarni Medicina. – 1992. – 37, N 7. – P. 371-377.
215. Norenberg U., Richter D. Processing of the oxytocin precursor: isolation of an exopeptidase from neurosecretory granules of bovine pituitaries // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1988. – 156, N 2. – P. 898-904.
216. Normant E., Loh Y.P. Carboxypeptidase E acts as a sorting receptor for routing proinsulin and proenkephalin but not chromogranin A to the regulated secretory pathway // FASEB Journal. – 1997. – 11, N 9, P. 431-431.
217. Normant E., Loh Y.P. Depletion of Carboxypeptidase E, a regulated secretory pathway sorting receptor, causes misrouting and constitutive secretion of proinsulin and proenkephalin, but not chromogranin A // Endocrinology. – 1998. – 139, N 4, P. 2137-2145
218. Nwe K.H.H., Morat P.B., Khalid B.A.K. Opposite effects of sex steroids on 11 beta hydroxysteroid dehydrogenase activity in the normal and adrenalectomized rat testis // Gen. Pharmacol. – 1997. – 28, N 5. – P. 661-664.
219. Olson G.A., Olson R.D., Kastin A.J. Endogenous opiates: 1985 // Peptides. – 1986. – 7, N 5. – P. 907-933.
220. Ortego J., Escribano J., Crabb J., Coca Prados M. Identification of a neuropeptide and neuropeptide processing enzymes in aqueous humor confers neuroendocrine features to the human ocular ciliary epithelium // J. Neurochem. – 1996. – 66, N 2. – P. 787-796.
221. Oyarce A.M., Hand T.A., Mains R.E., Eipper B.A. Dopaminergic regulation of secretory granule associated proteins in rat intermediate pituitary // J. Neurochem. – 1996. – 67, N 1. – P. 229-241.
222. Parkinson D. Carboxypeptidase H in bovine pituitary gland: soluble forms are not processed at the C-terminus // Mol. Cell. Endocrinol. – 1992. – 86, N 3. – P. 221-233.
223. Parkinson D. Two soluble forms of bovine carboxypeptidase H have different NH2-terminal sequences // J. Biol. Chem. – 1990. – 265, N 28. – P. 17101-17105.
224. Pekary A.E., Lukaski H.C., Mena I., Smith S.M., Bhasin S., Hershman J.M. Testosterone increases TRH biosynthesis in epididymis but not heart of zinc deficient rats // Peptides. – 1993. – 14, N 2. – P. 315-324.
225. Perloff M.D., Kream RM., Beinfeld M.C. Reduced levels of substance P in the brains of Cpe(Fat)/Cpe(Fat) Mice // Peptides. – 1998. – 19, N 6, P. 1115-1117.
226. Pineiro V., Casabiell X., Peino R., Lage M., Camina J.P., Menendez C., Baltar J., Dieguez C., Casanueva F.F. Dihydrotestosterone, stanozolol, androstenedione and dehydroepiandrosterone-sulfate inhibit leptin secretion in female but not in male samples of omental adipose tissue in vitro - lack of effect of testosterone // J. Endocrinology. –1999. – 160, N 3. – P. 425-432.
227. Plummer T.H., Hurwitz M.J. Human plasma carboxypeptidase N. Isolation and characterization // J. Biol. Chem. – 1978. – 253. –P. 3907-3912.
228. Pointis G, Latreille M.T, Richard M.O, D'Athis P., Cedard L. Effect of natural progesterone treatment during pregnancy on fetal testosterone and sexual behavior of the male offspring in the mouse // Dev. Pharmacol. Ther. – 1987. –10, N 5. – P. 385-392.
229. Porcelli G., Raffaelli R., Sacchi A., Volpe A.R., Miani C. Localization and characterization of human salivary kininases // Agents Actions Suppl. – 1992. – 38, N 1. – P. 401-406.
230. Pshezhetsky A.V., Potier M. Direct affinity purification and supramolecular organization of human lysosomal cathepsin A // Arch. Biochem. Biophys. – 1994. – 313, N 1. – P. 64-70.
231. Richer J.K., Lange C.A., Wierman A.M., Brooks K.M., Tung L., Takimoto G.S., Horwitz K.B. Progesterone Receptor Variants Found in Breast Cells Repress Transcription by Wild Type Receptors // Breast Canc. Res. Treat. – 1998. – 48, N 3. – P. 231-241.
232. Rodriguez C., Brayton K.A., Brownstein M., Dixon J.E. Rat preprocarboxypeptidase H. Cloning, characterization, and sequence of the cDNA and regulation of the mRNA by corticotropin releasing factor // J. Biol. Chem. – 1989. – 264, N 10. – P. 5988-5995.
233. Roselli C.E., Klosterman S.A. Sexual differentiation of aromatase activity in the rat brain effects of perinatal steroid exposure // Endocrinology. – 1998. – 139, N 7. – P. 3193-3201.
234. Rossier, J., Barres, E., Hutton, J.C., Ricknell, R.J. Radiometric assay for carboxypeptidase H (EC 3.4.17.10) and other carboxypeptidase B-like enzymes // Anal. Biochem. – 1989. – 178, N 1. – P. 27-31.
235. Rouille Y., Chauvet J., Acher R. Partial conversion of vasopressinyl-Gly-Lys-Arg into pharmacologically active vasopressin through secretory granule carboxypeptidase E and alpha-amidating processing enzymes // Biochem. Int. – 1992. – 26, N 4. – P.739-746.
236. Rovere C., Viale A., Nahon J., Kitabgi P. Impaired processing of brain proneurotensin and promelanin concentrating hormone in obese fat/fat mice // Endocrinology. – 1996. – 137, N 7. – P. 2954-2958.
237. Schlamp C.L., Nickells R.W. Light and dark cause a shift in the spatial expression of a neuropeptide processing enzyme in the rat retina // J. Neurosci. – 1996. – 16, N 7. – P. 2164-2171.
238. Seidah N.G., Chretien M. Proprotein and prohormone convertases of the subtilisin family - recent developments and future perspectives // Trends Endocrinol. Met. – 1992. – 3, N 4. – P. 133-140.
239. Sheikh I.A., Kaplan A.P. Mechanism of digestion of bradykinin and lysylbradykinin (kallidin) in human serum. Role of carboxypeptidase, angiotensin-converting enzyme and determination of final degradation products // Biochem. Pharmacol. – 1989. – 38, N 6. – P. 993-1000.
240. Shen F.S., Loh Y.P. Intracellular Misrouting and Abnormal Secretion of Adrenocorticotropin and Growth Hormone in Cpe (Fat) Mice Associated with a Carboxypeptidase E Mutation // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1997. – 94, N 10. – P. 5314-5319.
241. Shinohara T., Sakurada C., Suzuki T., Takeuchi O., Campbell W., Ikeda S., Okada N., Okada H. Pro-carboxypeptidase R cleaves bradykinin following activation // Int. Arch. Allergy Immunol. – 1994. – 103, N 4. – P. 400-404.
242. Silva W.I., Benitez K., Ocasio J., Martinez L., Rosario N. Neuropeptide like immunoreactivities and carboxypeptide H activity associated with bovine brain clathrin coated vesicles // Neuropeptides. –1995. – 28, N 6, P. 341-349.
243. Sirotkin A.V. Involvement of steroid hormones in bovine oocytes maturation invitro // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 1992. – 41, N 38. – P. 855-858.
244. Sirotkin A.V., Nitray J. Steroid hormones regulate cAMP and cGMP production by porcine granulosa cells in vitro // J. Steroid Biochem. Mol. Biol. – 1993. – 46, N 5. – P. 573-577.
245. Sirotkin A.V., Nitray J., Skokanova A., Politov V.P., Jurcovicova J. Marinchenko G.V. Release of a prolactin like substance by bovine granulosa cells in vitro: effects of ovarian steroids // Annales de Endocrinologie. – 1994. – 55, N 6. – P. 279-282.
246. Skidgel R.A., Bennett C.D., Schilling J.W., Tan F.L., Weerasinghe D.K., Erdos E.G. Amino acid sequence of the N-terminus and selected tryptic peptides of the active subunit of human plasma carboxypeptidase N: comparison with other carboxypeptidases // Biochem. Biophys. Res. Commun // 1988. – 15, N 154 (3). – P. 1323-1329.
247. Skidgel R.A., Davis R.M., Tan F. Human carboxypeptidase M. Purification and characterization of a membrane-bound carboxypeptidase that cleaves peptide hormones // J. Biol. Chem. – 1989. – 264, N 4. – P. 2236-2241.
248. Skidgel R.A., Johnson A.R., Erdos E.G. Hydrolisys of opioid hexapeptides by carboxypeptidase N. Presence of carboxypeptidase in cell membranes // Biochem. Pharmacol. – 1984. – 33, N 21. – P. 3471-3478.
249. Skidgel R.A., Tan F. Structural features of two kininase I-type enzymes revealed by molecular cloning // Agents Actions Suppl. – 1992. – 38, N 1. – P. 359-367.
250. Smith D.R., Pallen C.J., Murphy D., Lim L. Pituitary-specific transcriptional initiation sites of the rat carboxypeptidase-H gene and the influence of thyroid hormone status // Mol. Endocrinol. – 1992. – 6, N 5. – P. 713-722.
251. Smyth D.G., Maruthainar K., Darby N.J., Fricker L.D. Catalysis of slow C terminal processing reactions by carboxypeptidase H // J. Neurochem. – 1989. – 53, N 2. – P. 489-493.
252. Sochorova R., Mosnarova A., Huzulakova I. The possible influence of testosterone on calcium ion transport (investigated) in guinea pig uterus // Acta Phisiologica Hungarica. – 1991. – 77, N 1. – P. 19-24.
253. Song L.X., Fricker L. Processing of procarboxypeptidase E into carboxypeptidase E occurs in secretory vesicles // J. Neurochem. – 1995. – 65, N 1, P. 444-453.
254. Song L.X., Fricker L.D. The pro region is not required for the expression or intracellular routeing of carboxypeptidase E // Biochemical Journal. – 1997. – 323, N 4. – P. 265-271.
255. Song Lixin, Fricker L.D. Calcium and pH dependent aggregation of carboxypeptidase E // J. Biol. Chem. – 1995. – 270, N 14. – P. 7963-7967.
256. Stack G., Fricker L.D., Snyder S.H. A sensitive radiometric assay for enkephalin convertase and for carboxypeptidase B-like enzymes // Life Sci. – 1984. – 34. – P. 113-121.
257. Stanisz A.M., Scicchitano R., Payan D., Bienestock J. In vitro studies of immunoregulation by substance P and somatostatin // Second Intern. Workshop on NIM: Scientific Programme and Abstracts. – Dubrovnik, 1986. – P.37.
258. Steiner D.F. The biosynthesis of biologically active peptides: a perspective // Peptide Biosynthesis and Processing (Fricker L.D., ed.).– CRC Press, Boca Raton, Florida, 1991.– P. 1-16.
259. Stone T.E., Li J.P., Bernasconi P. Purification and Characterization of the Manduca Sexta Neuropeptide Processing Enzyme Carboxypeptidase E // Arch. Insect Biochem. Phisiol. – 1994. – 27, N 3, P. 193-203.
260. Strittmatter S.M., Lynch D.R., Snyder S.H. (3H)guanidinoethyl-mercaptosuccinic acid binding to tissue homogenates. Selective labeling of enkephalin convertase // J. Biol. Chem. – 1984. – 259, N 19. – P. 11812-11817.
261. Sullivan D.A., Kelleher R.S., Vaerman J.P., Hann L.E. Androgen Regulation of Secretory Component Synthesis by Lacrimal Gland Acinar Cells Invitro // J. Immunol. – 1990. – 145, N 12. – P. 4238-4244.
262. Supattapone S., Fricker L.D., Snyder S.H. Purification and characterization of a membrane-bound enkephalin-forming carboxypeptidase, “enkephalin convertase” // Neurochem. – 1984. – 42, N 4. – P. 1017-1023.
263. Tan F., Chan S.J., Steiner D.F., Schilling J.W., Skidgel R.A. Molecular cloning and sequencing of the cDNA for human membrane-bound carboxypeptidase M. Comparison with carboxypeptidases A, B, H, and N // J. Biol. Chem. – 1989. – 264, N 22. – P. 13165-13170.
264. Tanabe K., Tamura T., Saijo A., Kikuchi M., Sho R., Mashu A., Kobayashi T., Nozawa S. Modulation of progesterone secretion by androgens in porcine granulosa cell cultures // Horm. Res. – 1992. – 37, N S1. – P. 25-31.
265. Thiele E.A, Eipper B.A. Effect of secretagogues on components of the secretory system in AtT 20 cells // Endocrinology. – 1990. – 126, N 2. – P. 809-817.
266. Thomas A., Kim N.B., Amico J.A. Sequential exposure to estrogen and testosterone (T) and subsequent withdrawal of T increases the level of arginine vasopressin messenger ribonucleic acid in the hypothalamic paraventricular nucleus of the female rat // J. Neuroendocrinol. – 1996. – 8, N 10. – P. 793-800.
267. Thomas A., Shughrue P.J., Merchenthaler I., Amico J.A. The effects of progesterone on oxytocin messenger-RNA levels in the paraventricular nucleus of the female rat can be altered by the administration of diazepam or RU486 // J. Neuroendocrinol. – 1999. – 11, N 2, P. 137-144.
268. Tschernitz C, Laslop A, Eiter C, Kroesen S, Winkler H. Biosynthesis of large dense core vesicles in PC12 cells: effects of depolarization and second messengers on the mRNA levels of their constituets // Brain. Res. Mol. Brain Res. – 1995. – 31, N 1-2. – P. 131-140.
269. Udupi V., Gomez P., Song L.X., Varlamov O., Reed J.T., Leiter E.H., Fricker L.D., Greeley G.H. Effect of carboxypeptidase E deficiency on progastrin processing and gastrin messenger ribonucleic acid expression in mice with the fat mutation // Endocrinology. – 1997. – 138, N 5, P. 1959-1963.
270. Van Sande M., Hendriks D., Soons J., Scharpe S., Wevers R., Holmquist B. Post synthetic modificati-on of CK-MM by kininase I // Adv. Exp. Med. Biol // 1989. – 247A. – P. 319-324.
271. Varlamov O., Fricker L.D. The C terminal region of carboxypeptidase E involved in membrane binding is distinct from the region involved with intracellular routing // J. Biol. Chem. – 1996. – 271, N 11. – P. 6077-6083.
272. Varlamov O., Fricker L.D., Furukawa H., Steiner D.F., Langley S.H., Leiter E.H. Beta cell lines derived from trans genic Cpe(Fat)/Cpe(Fat) mice are defective in carboxypeptidase E and proinsulin processing // Endocrinology. – 1997. – 138, N 11, P. 4883-4892.
273. Varlamov O., Leiter E.H., Fricker L. Induced and spontaneous mutations at Ser202 of carboxypeptidase E. Effect on enzyme expression, activity, and intracellular routing // J. Biol. Chem. – 1996. – 271, N 24. – P. 13981-13986.
274. Voss A.K., Fortune J.E. Estradiol 17 beta has a biphasic effect on oxytocin secretion by bovine granulosa cells // Biol. Reprod. – 1993. – 48, N 6. – P. 1404-1409.
275. Wallace E.F., Evans C.J., Jurik, S.M., Mettord I.N., Barchas J.D. Carboxypeptidase B activity from adrenal medulla - is it involved in the processing of proenkephalin? // Life Sci. – 1982. – 31, N 16-17. – P. 1793-1796.
276. Wang W., Hendriks D.F., Scharpe S.S. Carboxypeptidase U, a plasma carboxypeptidase with highaffinity for plasminogen // J. Biol. Chem. – 1994. – 269, N 22. – P. 15937-15944.
277. Wardlow S.L. Regulation of β-endorphin, corticotropin-like intermediate lobe peptide, and α-melanotropin-simulating hormone in the hypothalamus by testosterone // Endocrinology. – 1986. – 119, N 1. – P. 19—24.
278. Weil S.J., Vendola K., Zhou J., Adesanya O.O., Wang J., Okafor J., Bondy C.A. Androgen receptor gene expression in the primate ovary cellular localization, regulation, and functional correlations // J. Clin. Endocrinol. Met. – 1998. – 83, N 7. – P. 2479-2485.
279. Wevers R.A., Boegheim J.P., Hommes O.R., Van Landeghem A.A., Mul-Steinbusch M.W., Van der Stappen J.W., Soon J.B. A study on post-synthetic modification in alpha-alpha enolase brought about by a human serum prtotein // Clin. Chem. Acta. – 1984. – 139. – P. 127-135.
280. Wilson M.A., Biscardi R. Influence of gender and brain region on neurosteroid modulation of GABA responses in rats // Life Sci. – 1997. – 60, N 19. – P. 1679-1691.
281. Yajima R., Chikuma T., Kato T. A rapid anterograde axonal transport of carboxypeptidase H in rat sciatic nerves // J. Neurochem. – 1994. – 63, N 3, P. 997-1002
282. Yamamoto T., Nishiyama M., Naka A. et.al. Role of epidermal grouwth factor in reproduction // Acta Obstetr. Gynaecol. Jap. – 1988. – 40, N 5. – P. 649-654.
283. Zheng M., Streck R.D., Scott R.E.M., Seidah N.G., Pintar J.E. The developmental expression in rat of proteases furin, Pc1, Pc2, and carboxypeptidase E - implications for early maturation of proteolytic processing capacity // J. Neurosci. – 1994. – 14, N 8. – P. 4656-4673.
284. Zisapels N., Sokolowsky M. Metallocarboxypeptidases: a cadmium carboxypeptidase B with peptidase activity // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1973. – 53, N 8. – P. 722.