

сти таковых в папиллярных аденокарциномах. Это может быть связано с различиями характера процессов трансформации эпителиальных клеток ЩЖ в случае формирования фолликулярных и папиллярных карцином.

Показано, что скорость деления клеток находится в обратной зависимости от уровня свободных радикалов. В клетках злокачественных опухолей наблюдается значительное снижение активности механизмов антиоксидантной защиты, однако эта недостаточность компенсируется путем накопления в опухолях жирорастворимых антиоксидантов, в первую очередь α -токоферола. В этих условиях способность активных форм кислорода тормозить деление клеток в опухоли снижается. Важно отметить, что реализация указанных механизмов существенно зависит от природы опухоли и стадии ее развития [1].

Выводы

1. Концентрация фрагментированной (низкомолекулярной) ДНК и интенсивность стимулированной межнуклеосомной фрагментации ДНК в ткани папиллярной аденокарциномы значительно снижены. В ткани фолликулярной аденокарциномы уровень фрагментированной ДНК повышен, а интенсивность межнуклеосомной фрагментации ДНК существенно не отличается от таковой в нормальной ткани ЩЖ.

2. α -Токоферол и KI in vitro в концентрации 10^{-7} М снижают интенсивность стимулированной межнуклеосомной фрагментации ДНК в нормальной ткани ЩЖ и менее значительно в ткани фолликулярных карцином. Эффект препаратов в ткани папиллярных карцином отсутствует.

ЛИТЕРАТУРА

1. Барабой В. А. Биоантиоксиданты. — Киев, 2006.
2. Гринюк І. І., Корнійчук Г. М., Капралов О. О., Матусевська О. П. // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 5. — С. 90–95.
3. Калініченко О. В., Мишунина Т. М., Пилькевич Л. І. та ін. // Ендокринологія. — 2007. — Т. 12, № 1. — С. 48–57.
4. Коваль Т. В., Ковальова В. А., Дворченко К. О. та ін. // Пробл. екол. та медичн. генетики і клітин. імунол. (Київ). — 2001. — № 7 (39). — С. 119–125.
5. Комаревцева Е. В. // Укр. мед. альманах. — 2004. — Т. 7, № 3. — С. 168–170.
6. Лушников Е. Ф., Абросимов А. Ю. Гибель клетки (апоптоз). — М., 2001.
7. Петрова Г. В., Донченко Г. В. // Укр. біохім. журн. — 2004. — Т. 76, № 1. — С. 103–107.
8. Сагац В. Ф., Вавилова Г. Л., Струтинська Н. А., Аконова О. В. // Фізіол. журн. — 2003. — Т. 49, № 1. — С. 3–12.
9. Сухих Г. Т., Серов В. Н., Деметьева М. М. и др. // Акуш. и гин. — 2000. — № 4. — С. 41–45.
10. Burikhanov R., Matsuzaki S. // Thyroid. — 2000. — Vol. 10, N 2. — P. 123–129.
11. Langer R., Burzler C., Bechner G., Gartner R. // Exp. Clin. Endocrinol. Diabet. — 2003. — Vol. 111, N 6. — P. 325–329.
12. Lee M., Chen G., Vantis A. et al. // Cancer J. — 2005. — Vol. 11, N 2. — P. 113–121.
13. Moore D., Ohene-Fianko D., Garcia B., Chakrabarti S. // Histopathology. — 1998. — Vol. 32, N 1. — P. 35–42.
14. Shrivastava A., Tiwari M., Sinha R. et al. // J. Biol. Chem. — 2006. — Vol. 281, N 28. — P. 19762–19771.
15. Sreelekha T., Pradeep V., Vijayalakshmi K. et al. // Thyroid. — 2000. — Vol. 10, N 2. — P. 117–122.
16. Szende B. // Magy. Onkol. — 2004. — Vol. 48, N 3. — P. 215–219.
17. Teel G., Pines A., Arturi F. et al. // Endocrinolog. — 2004. — Vol. 145, N 10. — P. 4660–4666.
18. Vitale M., Di Matola T., D'Ascoli F. et al. // Endocrinology. — 2000. — Vol. 141, N 2. — P. 598–605.
19. Volante M., Papotti M., Gugliotta P. et al. // J. Histochem. Cytochem. — 2001. — Vol. 49, N 8. — P. 1003–1011.
20. Wang S., Baker J. // Thyroid Cancer: A Comprehensive Guide to Clinical Management. — 2nd Ed. / Eds L. Wartofsky, D. Van Nostrand. — Totowa, 2006. — P. 55–61.

Поступила 24.01.08

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2009

УДК 612.018.2:577.175.53].014.1.084

Л. Е. Панин, Л. М. Поляков, И. Ф. Усынин, Д. В. Суменкова, Р. А. Князев

ВЛИЯНИЕ КОРТИКОСТЕРОИДОВ В КОМПЛЕКСЕ С АПОЛИПОПРОТЕИНОМ А-І НА БИОСИНТЕЗ БЕЛКА В КУЛЬТУРЕ ГЕПАТОЦИТОВ

ГУ НИИ биохимии (дир. — акад. РАМН Л. Е. Панин) СО РАМН, Новосибирск

Показано, что стероидные гормоны, содержащие в А-кольце восстановленную Δ^4 , 3-кетогруппу в комплексе с аполипопротеином А-І увеличивают скорость биосинтеза белка в культуре гепатоцитов крыс. Биологическая активность гормонов зависит от положения оксигруппы у 3-го углеродного атома и водорода у 5-го углеродного атома. Для проявления биологического эффекта более предпочтительной является цис-позиция. Оксигруппа в 3-м положении А-кольца гормона может быть заменена на сульфогруппу. Дегидроэпиандростерон-сульфат в комплексе с аполипопротеином А-І увеличивает скорость биосинтеза белка в культуре гепатоцитов крыс, что подтверждает участие этого гормона в регуляции экспрессии генов.

Ключевые слова: стероидные гормоны, аполипопротеин А-І, гепатоциты, биосинтез белка.

L. Ye. Panin, L. M. Polyakov, I. F. Usynin, D. V. Sumenkova, R. A. Knyazev

EFFECT OF A COMPLEX OF CORTICOSTEROIDS WITH APOLIPOPROTEIN A-I ON PROTEIN BIOSYNTHESIS IN CULTURED HEPATOCYTES

Research Institute of Biochemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk

A complex of apolipoprotein A-I with steroid hormones containing reduced Δ^4 , 3-ketogroup in the A ring was shown to increase the rate of protein synthesis in the cultured rat hepatocytes. The biological activity of the hormones depends on the position of the oxygroup of the third carbonic atom and hydrogen at the fifth position of a carbonic atom. The cis-position is more preferable for the biological effect. The oxygroup at the third position of the A-ring may be replaced by the sulfo-group. The complex of dehydroepiandrosterone sulphate with apolipoprotein A-I increases the rate of protein biosynthesis in the cultured rat hepatocytes, which confirms the involvement of this hormone in the regulation of gene expression.

Key words: steroid hormones, apolipoprotein A-I, hepatocytes, protein biosynthesis.

Ранее было показано, что липопротеины различных классов (очень низкой плотности — ЛПОНП, низкой плотности — ЛПНП и высокой плотности — ЛПВП) являются транспортной формой стероидных гормонов в крови [2]. Методом тушения триптофановой флуоресценции показано, что стероиды в липопротеинах взаимодействуют с белками. Для ЛПВП таким белком является аполипопротеин А-I (апоА-I). Константа ассоциации (K_{acc}) апоА-I с кортизолом оказалась равной $1,66 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Для сравнения укажем, что K_{acc} с транскортином для широкого спектра кортикостероидов равна $3 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ [7]. Для ЛПВП K_{acc} с кортизолом составляет $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, т. е. является величиной сопоставимой [10]. Возникает вопрос, какой класс биологических явлений стоит за этой транспортной формой стероидных гормонов?

С помощью иммунохимических методов апоА-I был обнаружен нами в ядрах клеток многих органов и тканей: головной мозг, печень, почки, легкие, сердце, мышцы, надпочечники, семенники, селезенка, костный мозг [3, 4]. Оказалось, что апоА-I присутствует в транскрипционно активном хроматине, ядерном матриксе и во фракции кислых негистоновых белков, а значит имеет отношение к регуляции экспрессии генов. В настоящее время выяснены молекулярные механизмы этого явления [9, 10]. Они связаны с взаимодействием комплексов восстановленных форм стероидных гормонов и апоА-I с GC-богатыми участками ДНК, с разрывом водородных связей в GC-парах, взаимодействием РНК-полимеразы с одноцепочечными участками ДНК [5]. Данный механизм был наиболее полно раскрыт при изучении такой пары стероидных гормонов как кортизол и его восстановленная форма — тетрагидрокортизол (ТГК). Однако неясно, распространяется ли упомянутый механизм действия на другие гормоны? В связи с этим мы провели сравнительные исследования данной пары гормонов и таких стероидных гормонов, как андростерон и дегидроэпиандростерон-сульфат (ДГЭАС).

Материалы и методы

Работа выполнена на изолированных гепатоцитах крыс-самцов линии Вистар массой 180–200 г. Гепатоциты выделяли методом рециркуляторной ферментативной перфузии с использованием 0,03% раствора коллагеназы ("ICN Biomedicals, Inc", США) и отделяли от непаренхимных клеток с помощью дифференциального центрифугирования. Жизнеспособность клеток, оцениваемая методом исключения трипанового синего ("Serva", Германия), составляла не менее 90%. Инкубацию проводили в CO_2 -инкубаторе ("Cole-Parmer", США) в атмосфере, содержащей 5% CO_2 и 95% воздуха.

Информация для контактов:

Поляков Лев Михайлович
НИИ биохимии СО РАМН
Адрес: 630117, Новосибирск, ул. Академика Тимакова, 2.
plm@asoramn.ru



Рис. 1. Химические формулы стероидных гормонов.

Липопротеины плазмы крови выделяли методом ультрацентрифугирования в растворах КВг на центрифуге Optima L-90K ("Beckman-Coulter", Австрия). Делипидирование фракций ЛПВП проводили охлажденной смесью этанол-ацетон (1:1) с последующей многократной отмывкой эфиром. АпоА-I выделяли методом гель-фильтрации на колонке $1,6 \times 100 \text{ см}$ с сефарозой CL-6B ("Amersham Biosciences", Швеция). Анализ чистоты апоА-I проводили методом электрофореза в ПААГ с додецилсульфатом натрия ("Serva", Германия).

Комплекс апоА-I со стероидными гормонами получали, выдерживая их смесь в молярном соотношении 1:2. Концентрация апоА-I в среде инкубации составляла 60 мкг/мл. В работе использовали кортизол, андростерон, ДГЭАС ("Amersham", Англия). ТГК был любезно предоставлен академиком РАМН Ю. А. Панковым (Институт экспериментальной эндокринологии РАМН).

Скорость биосинтеза белка в культуре гепатоцитов определяли по включению радиоактивной метки в количестве 2 мКи/мл среды, используя ^{14}C -лейцин ("Amersham", Англия). Радиоактивность образцов измеряли на жидкостном сцинтилляционном счетчике ("Mark-III", США) и выражали в имп/мин на 1 мг белка. Статистическую значимость полученных результатов оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В работе использовали андростерон — метаболит тестостерона и андростендиона, в котором оксигруппа гормона в 3-м положении и водород в 5-м положении находятся в транс-позиции; ДГЭАС — гормон сетчатой зоны коры надпочечников, в котором оксигруппа в 3-м положении кольца А заменена на сульфогруппу, находящуюся в цис-позиции, а углерод в 5-м положении не имеет атомов водорода; кортизол — гормон пучковой зоны коры надпочечников, содержащий Δ^4 , 3-кетогруппу в



Рис. 2. Влияние андростерона, ДЭАС, кортизола, ТГК и апоА-I на скорость биосинтеза белка в гепатоцитах; * — достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

кольце А, и тетрагидрокортизол — основной метаболит кортизола, содержащий восстановленную Δ^4 , 3-кетогруппу в А-кольце в транс-позиции и водород в 5-м положении в цис-позиции и считавшийся неактивной формой гормона [8]. Структуры этих гормонов представлены на рис. 1. Отражаются ли структурные особенности гормонов на их биологических свойствах, в частности на скорости биосинтеза белка?

Оказалось, что скорость биосинтеза белка под влиянием комплекса андростерон—апоА-I не изменялась по сравнению с действием одного апоА-I и контроля (рис. 2). Комплекс ДГЭАС—апоА-I резко усиливал скорость биосинтеза белка, как по сравнению с действием одного апоА-I или одного гормона, так и по сравнению с контролем. Комплекс кортизол—апоА-I не влиял на скорость включения ^{14}C -лейцина в белок гепатоцитов, в то время как комплекс ТГК—апоА-I значительно ее усиливал, как по сравнению с действием одного апоА-I, так и по сравнению с действием одного гормона. Однако самый высокий результат оказался в случае использования комплекса ДГЭАС—апоА-I.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что для проявления биологического эффекта (усиления биосинтеза белка) в стероидных гормонах должна присутствовать оксигруппа в 3-м положении А-кольца, которая может быть заменена на сульфогруппу. Наличие водорода у 5-го углеродного атома необязательно. Хотя его присутствие (цис-или транс-позиция) может иметь значение при взаимодействии комплекса с ДНК. Вероятно, то же можно сказать и о позиции оксигруппы в 3-м положении А-кольца. Для биологического действия гормона предпочтительнее цис-позиция.

Следует отметить, что восстановленные формы стероидных гормонов (тетрагидросоединения) оказывают биологическое действие в комплексе с апоА-I. Данные комплексы образуются в резидентных макрофагах при кооперативном захвате ЛПВП и стероидных гормонов [9]. Не менее важная роль принадлежит дегидроэпиандростерону, который синтезируется в основном в сульфатированной форме. Функция этого гормона до конца не изуче-

на, однако есть указание на то, что он принимает участие в регуляции транскрипции [6]. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что это может происходить при участии комплекса ДГЭАС—апоА-I. Формирование такого комплекса было подтверждено нами с помощью ИК-спектроскопии и методом тушения триптофановой флюоресценции.

Таким образом, указанные различия в структуре стероидных гормонов наиболее важны при взаимодействии соответствующих комплексов с ядерной ДНК. Другие группы стероидных гормонов принципиальной роли в данном механизме не играют. ЛПВП, как транспортная форма стероидных гормонов, определяют участие последних в усилении биосинтеза белка. Мы полагаем, что это имеет прямое отношение к регуляции таких процессов, как пролиферация клеток и внутриклеточная регенерация.

Выводы

1. Восстановленные формы стероидных гормонов (тетрагидросоединения) обладают высокой биологической активностью. В комплексе с апоА-I они повышают скорость биосинтеза белка в гепатоцитах.
2. ДГЭАС в комплексе с апоА-I усиливает скорость биосинтеза белка в гепатоцитах, что подтверждает участие этого гормона в регуляции экспрессии генов.
3. В механизме усиления биосинтеза белка важную роль играет оксигруппа в 3-м положении А-кольца стероидных гормонов, которая может быть заменена на сульфогруппу.
4. Андростерон, у которого оксигруппа в 3-м положении А-кольца и водород при 5-м углеродном атоме находятся в транс-позиции, не обладает биологической активностью. Более предпочтительной для биологического эффекта является цис-позиция этих групп.

ЛИТЕРАТУРА

1. Обут Т. А. Андрогены в адаптации организма: биологическая значимость надпочечников андрогенов. — Новосибирск, 2004.
2. Панин Л. Е., Поляков Л. М., Розуменко А. А., Биушкина Н. Г. // *Вопр. мед. химии*. — 1988. — № 5. — С. 56–58.
3. Панин Л. Е., Поляков Л. М., Кузьменко А. П. и др. // *Биохимия*. — 1992. — Т. 57, вып. 6. — С. 826–831.
4. Панин Л. Е., Русских Г. С., Поляков Л. М. // *Биохимия*. — 2000. — Т. 65, вып. 12. — С. 1684–1689.
5. Панин Л. Е., Гимаутдинова О. И., Кузнецов П. А. и др. // *Биохимия*. — 2002. — Т. 67, вып. 7. — С. 953–958.
6. Роживанов Р. В., Вакс В. В. // *Пробл. эндокринолог.* — 2005. — Т. 51, № 2. — С. 45–51.
7. Сергеев П. В., Галенко-Ярошевский П. А., Шимановский И. Л. *Очерки биохимической фармакологии*. — М., 1996.
8. Юдаев Н. А., Афиногенова С. А., Крехова М. А. // *Биохимия гормонов и гормональной регуляции*. — М., 1976. — С. 171–227.
9. Panin L. E., Maksimov V. F., Usynin I. F., Korostyshevskaya I. M. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 2002. — Vol. 81. — P. 69–76.
10. Panin L. E., Kunitsyn V. G., Tusikov F. V. // *Int. J. Quantum Chem.* — 2005. — Vol. 101. — P. 450–467.

Поступила 10.04.07