

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1998

УДК 612.018:577.175.632].08

А. Н. Смирнов, Е. В. Покровская, В. П. Шевченко, И. С. Левина, А. В. Камерницкий

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ СЕЛЕКТИВНОГО АГОНИСТА ПРОГЕСТЕРОНА 16 α , 17 α -ЦИКЛОГЕКС-3'-ЕНОПРОГЕСТЕРОНА С РЕЦЕПТОРОМ ПРОГЕСТЕРОНА МАТКИ КРЫСЫ

Лаборатория эндокринологии (руководитель — доктор биол. наук А. Н. Смирнов) биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова; лаборатория изотопно-меченных биологически активных веществ (руководитель — проф. Н. Ф. Мясоедов) Института молекулярной генетики РАН; группа химии стероидов и оксипиринов (руководитель — проф. А. В. Камерницкий) Института органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН

Проведено сравнительное изучение характеристик связывания [^3H]-16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестерона (I) и [^3H]-прогестерона (II) с белками растворимой фракции матки крысы. Установлено, что I специфически взаимодействует с рецептором прогестерона, но не с другими белками. Его сродство к рецептору, оцененное по величинам K_d ($11,6 \pm 2,0$ нМ), K_i (15 нМ), относительной конкурентной активности ($0,89 \pm 0,35$ и $0,33 \pm 0,04$ при использовании [^3H]-I и [^3H]-II соответственно), лишь незначительно уступает сродству природного гормона ($K_d = 6,9 \pm 2,6$ нМ; $K_i = 8,5$ нМ; относительная конкурентная активность = 1). Диссоциация комплексов [^3H]-I и [^3H]-II с рецептором носила двухфазный характер при сходных величинах константы скорости диссоциации ($k_{-1} = 1,8 \cdot 10^{-5} \text{ C}^{-1}$; $k'_{-1} = 4,5 \cdot 10^{-4} \text{ C}^{-1}$). Особенности взаимодействия [^3H]-I с рецептором по сравнению с [^3H]-II служат меньшая доля быстродиссоциирующих [^3H]-I-комплексов и меньшая способность [^3H]-I предотвращать деградацию рецептора. Высказано предположение, что выявленные особенности отражают различия в конформации рецептора и сопряжены с селективностью действия I.

Binding of [^3H]-16 α -cyclohex-3'-enoprogesterone (I) and [^3H]-progesterone (II) with soluble fraction proteins of the rat uterus is compared. I specifically reacts with progesterone receptor but not with other proteins. Its affinity to the receptor assessed from K_d (11.6 ± 2.0 nM), K_i (15 nM) values and relative competitive activity (0.89 ± 0.35 and 0.33 ± 0.04 with [^3H]-I and [^3H]-II, respectively) is just negligibly inferior to the affinity of the natural hormone ($K_d = 6.9 \pm 2.6$ nM, $K_i = 8.5$ nM, relative competitive activity = 1). The dissociation of [^3H]-I and [^3H]-II complexes with the receptor was biphasic with similar constants of dissociation rate ($k_{-1} = 1.8 \cdot 10^{-5} \text{ C}^{-1}$; $k'_{-1} = 4.5 \cdot 10^{-4} \text{ C}^{-1}$). Specific features of [^3H]-I reaction with the receptor in comparison with [^3H]-II are a lesser share of rapidly dissociating [^3H]-I complexes and a lower capacity of [^3H]-I to prevent the receptor degradation. It is probable that the detected features reflect the differences in the receptor conformation and are associated with the selectivity of I action.

Отличительной особенностью биологического действия аналога прогестерона ряда D'-пентаранов — 16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестерона (I), содержащего дополнительное циклогексеновое D'-кольцо, — служит избирательность его эффектов: при системном введении это соединение проявляло более высокую по отношению к действию прогестерона (II) активность в тесте сохранения беременности и сравнительно низкую — в тесте пролиферации эндометрия [1]. Выяснение механизмов возникновения селективности в действии аналогов прогестерона могло бы дать ключ к созданию новых гормонально-активных соединений с заданными медико-биологическими характеристиками. Проведенное в настоящей работе изучение кинетических параметров связывания I с рецептором прогестерона на базе разработанного нами метода синтеза тритированной формы I было предпринято с целью выявления особенностей лиганд-рецепторного взаимодействия, отличающих агонист избирательного действия от природного гормона.

Материалы и методы

В работе использовали синтезированный нами [1, 2- ^3H]-16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестерон ([^3H]-I) с удельной радиоактивностью 41 Ки/ммоль и [1, 2, 6, 7- ^3H]-прогестерон (^3H -II) фирмы "Amersham" (Англия) с удельной радиоактивностью 84 Ки/ммоль. Чистоту препаратов контролировали тонкослойной хроматографией в системе хлороформ/этиловый эфир 17:3 (объем/объем). Немеченый I синтезирован нами [2], немеченый II получен от фирмы "Sigma" (США). В качестве источника рецептора прогестерона использовали матки крыс смешанной популяции массой 180—220 г следующих групп: интактных, получавших эстрадиол в дозе 1 мкг в 0,4 мл пропиленгликоля внутримышечно в течение 5 дней, а также животных на 13—14-й или 18—20-й день беременности. Все процедуры проводили при 0—4°C. Ткань матки измельчали и гомогенизировали в 10 мМ трис-HCl-буфере (pH 7,5), содержавшем 10 мМ KCl, 1 мМ дитиотреитола, 0,5 мМ фенолметилсульфонилфторида и 30% (объем/объем) глицерина. Со-

отношение ткань/буфер варьировали от 1:2,5 до 1:8 (масса/объем) в зависимости от ожидаемой концентрации рецептора прогестерона. Гомогенат центрифугировали при 50 000 g 1 ч. При использовании материала от беременных животных для удаления эндогенных гестагенов надосадочную фракцию обрабатывали 30 мин активированным углем (Norit A), покрытым декстраном 70 000 (конечные концентрации 1 и 0,2% соответственно), с последующим осаждением угля центрифугированием [13]. Для определения специфичности сродства лиганд-белкового взаимодействия аликвоты надосадочной фракции (100 мкл) с концентрацией белка 4–12 мг/мл инкубировали с $2 \cdot 4 \cdot 10^3$ Бк [^3H]-лиганда в присутствии 3 мкМ гидрокортизона и варьирующих концентраций немеченых лигандов в конечном объеме 200 мкл 5 ч. Несвязанный лиганд удаляли обработкой активированным углем, покрытым декстраном (конечные концентрации 0,67 и 0,13%), в течение 5 мин с последующим центрифугированием. В аликвотах надосадочной фракции измеряли содержание радиоактивности на жидкостном сцинтилляционном спектрометре "Rackbeta 1217" с эффективностью счета 30%. Количество специфически связанного [^3H]-лиганда оценивали по разнице между величинами связанной радиоактивности, измеренными в отсутствие (суммарное связывание) и в присутствии избытка (3 мкМ) немеченого стероида (неспецифическое связывание). Относительную конкурентную активность определяли методом S. Kogenman [12], характер ингибирования связывания и равновесную константу диссоциации оценивали в двойных обратных координатах [10], константу ингибирования измеряли в производных координатах наклон—концентрация [9]. Для изучения кинетики диссоциации [^3H]-лиганд-белковых комплексов надосадочную фракцию гомогената инкубировали с [^3H]-стероидом 1 ч, добавляли избыток (3 мкМ) немеченого лиганда и измеряли количество специфически связанной радиоактивности через 20–300 мин обработкой проб активированным углем. Анализ результатов проводили методом B. Weichman и A. Notides [14]. Влияние лиганда на стабильность рецептора изучали по динамике уровня специфического связывания [^3H]-стероидов. Тестирование изменений связывающей активности рецептора в отсутствие лиганда проводили с помощью инкубации в течение 1 ч с [^3H]-II. Концентрацию белка определяли окраской кумасси [8]. Все операции проводили в кварцевых пробирках, покрытых 3% альбумином, для подавления гидрофобной адсорбции I [4].

Результаты и их обсуждение

[^3H]-16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестерон специфически (т. е. с высоким сродством и ограниченной емкостью) связывается белком растворимой фракции матки крысы. Величина K_d взаимодействия I с белком (см. таблицу) лишь ненамного превышает аналогичный параметр природного гормона. Линейный характер изотермы связывания (рис. 1) свидетельствует об однородности связывающих участков белка по сродству к I.

Кинетические параметры взаимодействия прогестерона (II) и 16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестерона (I) с белком растворимой фракции матки крысы

Меченый лиганд	Относительная конкурентная активность*	K_i , нМ (I)	K_i , нМ (II)	K_d , нМ	$K_{1/2}$, $\text{C}^{-1} \cdot 10^5$
[^3H]-прогестерон	$0,33 \pm 0,04$ (3)	15 (2)	—	$6,9 \pm 2,6$ (3)	1,8 (2)
[^3H]-16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестерон	$0,89 \pm 0,35$ (4)	—	8,5 (2)	$11,6 \pm 2,0$ (4)	1,7 (2)

Примечание. В скобках — число определений. * — за 1 принята активность прогестерона.

Немеченый II способен полностью вытеснять [^3H]-I из специфических комплексов с белком, и это ингибирование носит конкурентный характер, о чем свидетельствует пересечение изотерм в точке на оси ординат, соответствующей величине $1/V_{\text{max}}$ (см. рис. 1). Эффективность, с которой II вытесняет [^3H]-I из комплексов с белком, оцениваемая по величинам K_i и относительной конкурентной активности (см. таблицу), соответствует величине

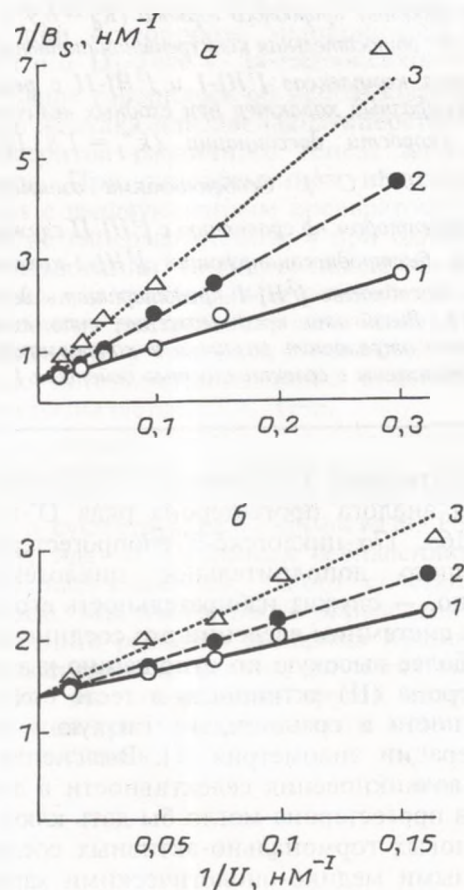


Рис. 1. Анализ ингибирования связывания [^3H]-16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестерона прогестероном (а) и связывания [^3H]-прогестерона 16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестероном (б) в растворимой фракции матки эстрогенизированных и беременных крыс соответственно. 1 — в отсутствие конкурента, 2 и 3 — в присутствии 7 и 14 нМ конкурента. V_s — специфически связанный [^3H]-лиганд; U — несвязанный лиганд. Конечная концентрация белка 2,8 мг/мл (а) и 5,1 мг/мл (б).

K_d связывания белком самого $[^3H]$ -II. Эти результаты позволяют сделать заключение о том, что I связывается белком, идентичным рецептору прогестерона, и что других специфических участков связывания I в растворимой фракции матки крысы нет. Данный вывод подтверждается анализом ингибирования I связывания $[^3H]$ -II (см. таблицу, рис. 1): при таком варианте экспериментов результаты симметричны описанным выше.

Хроматографический анализ радиоактивного материала, выделенного после инкубации $[^3H]$ -I и $[^3H]$ -II с растворимой фракцией матки, показал отсутствие метаболических превращений $[^3H]$ -лигандов. Существенных различий в характере взаимодействия $[^3H]$ -I и $[^3H]$ -II с рецептором, полученным от животных разных групп, не обнаружено.

Анализ кинетики диссоциации специфических комплексов $[^3H]$ -I с белком (рис. 2) свидетельствует о двухфазности процесса. Учитывая линейный характер равновесных изотерм связывания I (см. выше), следует предположить, что кинетика процесса ассоциации I с белком также носит двухфазный характер. Двухфазный тип кинетики диссоциации наблюдается и в случае комплексов белка с $[^3H]$ -II (см. рис. 2). Величины константы скорости диссоциации для медленной фазы (k_{-1}) процесса распада комплексов I и II с рецептором близки между собой (см. таблицу). Надежное измерение величины k'_{-1} для быстрой фазы диссоциации комплексов I с белком при данной постановке экспериментов затруднено, но приближительная оценка дает величину, близкую к аналогичному параметру для II ($\approx 5 \cdot 10^{-4} \text{ C}^{-1}$). Вместе с тем в кинетике диссоциации комплексов I и II имеется существенное различие, касающееся доли быстродиссоциирующих комплексов: в случае I

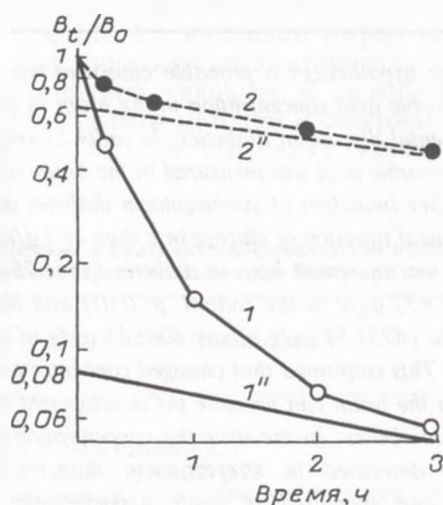


Рис. 2. Кинетика диссоциации комплексов $[^3H]$ -прогестерона (1) и $[^3H]$ -16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестерона (2) с белком растворимой фракции матки intactных крыс. B_0 — исходное; B_t — текущее значение количества специфически связанного $[^3H]$ -лиганда. 1'' и 2'' — результат вычитания быстродиссоциирующего компонента. Конечная концентрация белка 2,7 мг/мл.

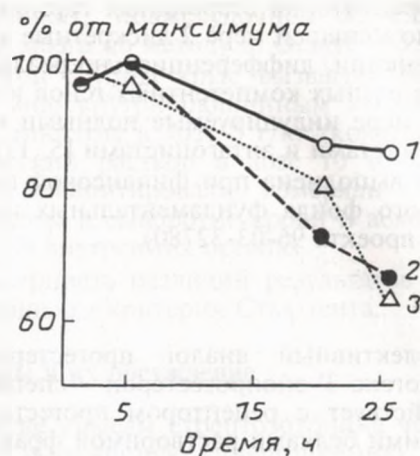


Рис. 3. Динамика уровня специфического связывания $[^3H]$ -прогестерона (1) и $[^3H]$ -16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестерона (2) белком растворимой фракции матки intactных крыс. 3 — прогестеронсвязывающая активность неоккупированного лиганда белка. Представлены средние величины 2 экспериментов. Конечная концентрация белка 3,1 и 2,2 мг/мл.

вклад этих комплексов в суммарное связывание составлял около 30%, а в случае II — более 90%.

Различия в свойствах комплексов I и II с белком обнаружены также при анализе динамики изменений в уровне специфического связывания $[^3H]$ -I и $[^3H]$ -II в ходе инкубации с растворимой фракцией матки (рис. 3). Максимальный уровень специфического связывания в обоих случаях наблюдался через 5 ч инкубации, но при использовании $[^3H]$ -I последующее уменьшение связывания было существенно более глубоким, чем при использовании $[^3H]$ -II, и соответствовало снижению связывающей активности рецептора прогестерона в отсутствие лиганда.

Использование тритированной формы I для анализа взаимодействия этого аналога прогестерона с белками растворимой фракции матки крысы позволило отчасти снять неопределенность в вопросе об особенностях проведения сигнала I. Очевидно, что классический рецептор прогестерона может быть посредником действия I на матку и что другого, специального рецептора для I в растворимой фракции матки нет. Не исключено, что "ножницы" между различными типами биологической активности I [1] обусловлены разной представленностью основных путей действия гестагенов (геномного и негеномного) в разных тканях. Установлено, что гормональная специфичность экстрануклеарного пути действия гестагенов существенно отличается от таковой классического ядерного рецептора [6, 7]. Более того, ранее было обнаружено, что I не конкурирует с $[^3H]$ -II за связывающие участки плазматической мембраны матки крысы [3]. Вместе с тем полученные нами результаты о различиях в свойствах комплексов I и II с рецептором прогестерона (соотношение быстро- и медленно диссоциирующих комплексов, степень защиты рецептора от деградации) могут отражать различия в конформации соответствующих лиганд-рецепторных комплексов. Вероятно, эти особенности сопряжены с избирательностью действия I. В структуре молекул

ядерных рецепторов стероидных гормонов обнаружены по меньшей мере 2 дискретные активационные функции, дифференциально реализуемые в контексте разных компетентных генов и тканей и в разной мере индуцируемые полными и частичными агонистами и антагонистами [5, 11].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (код проекта 96-03-32780).

Выводы

1. Селективный аналог прогестерона 16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестерон специфически взаимодействует с рецептором прогестерона, но не с другими белками растворимой фракции матки крысы.

2. Сродство 16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестерона к рецептору прогестерона ($K_d = 11,6$ нМ) несколько ниже сродства прогестерона ($K_d = 6,9$ нМ); прочность комплексов аналога с рецептором ($k_{-1} = 1,8 \cdot 10^{-5}$ с $^{-1}$, $k_{+1} \approx 4,5 \cdot 10^{-4}$ с $^{-1}$) сходна с таковой для прогестерона.

3. Конформация рецептора прогестерона в комплексе с 16 α , 17 α -циклогекс-3'-енопрогестероном отличается от конформации рецептора в комплексе с прогестероном, что отражается в меньшем соотношении быстро- и медленно дис-

социирующих лиганд-рецепторных комплексов в случае аналога и в меньшей способности аналога защищать рецептор от деградации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Камерницкий А. В., Левина И. С. // Хим.-фарм. журн. — 1991. — № 10. — С. 4—16.
2. Левина И. С., Камерницкий А. В. // Там же. — 1990. — № 10. — С. 31—39.
3. Сергеев П. В., Камерницкий А. В., Карева Е. Н. и др. // Бюл. exper. биол. — 1994. — № 7. — С. 34—35.
4. Смирнов А. Н., Яковенко А. Р., Левина И. С., Камерницкий А. В. // Биохимия. — 1996. — Т. 61, № 8. — С. 1960—1970.
5. Von Angerer E., Biberger C., Holler E. et al. // J. Steroid Biochem. — 1994. — Vol. 49, N 1. — P. 51—62.
6. Bielefeldt K., Waite L., Abboud F. M., Conklin J. L. // Amer. J. Physiol. — 1996. — Vol. 271. — P. 370—376.
7. Blackmore P. E., Fisher J. F., Spilman C. H., Blasdele J. E. // Mol. Pharmacol. — 1996. — Vol. 49, N 4. — P. 727—739.
8. Bradford M. M. // Anal. Biochem. — 1976. — Vol. 72, N 1. — P. 248—254.
9. Dixon M. // Biochem. J. — 1972. — Vol. 129, N 1. — P. 197—202.
10. Hughes T. R., Klotz I. M. // Meth. Biochem. Anal. — 1956. — Vol. 3. — P. 265—300.
11. Klinge C. M., Traish A. M., Bambara R. A., Hilf R. // J. Steroid Biochem. — 1996. — Vol. 57, N 1—2. — P. 51—66.
12. Korenman S. G. // Endocrinology. — 1970. — Vol. 87, N 6. — P. 1119—1123.
13. Yu Hai M. T., Logeat F., Milgrom E. // J. Endocrinol. — 1978. — Vol. 76, N 1* — P. 43—48.
14. Weichman B. M., Notides A. C. // J. Biol. Chem. — 1977. — Vol. 252, N 24. — P. 8856—8862.

Поступила 23.04.97

© И. П. ГРИГОРЬЕВ, 1998

УДК 616.153.455-008.61-07:616.831.31-018.1:547.475.2]-092.2

И. П. Григорьев

КОНЦЕНТРАЦИЯ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ В КОРЕ БОЛЬШОГО МОЗГА И ВНУТРЕННИХ ОРГАНАХ КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ И ОСТРОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Отдел морфологии (зав. — член-корр. РАН В. А. Отеллин) Института экспериментальной медицины (дир. — акад. РАН Б. И. Ткаченко) РАН, Санкт-Петербург

Высказывается гипотеза о возможной каузальной роли изменения концентрации аскорбиновой кислоты в головном мозге в развитии психопатологии у диабетиков. Для проверки гипотезы измеряли содержание аскорбиновой кислоты в коре мозга крыс через 21 сут после индукции стрептозотоцинового диабета или через 1 ч после внутрибрюшинной инъекции раствора глюкозы в дозе 5 г/кг. Впервые установлено, что концентрация аскорбиновой кислоты в коре мозга крыс повышена как при диабете (456 ± 26 мкг/г ткани против 415 ± 37 мкг/г в контроле; $p < 0,01$), так и при острой гипергликемии (475 ± 54 мкг/г ткани против 406 ± 65 мкг/г в контроле; $p < 0,001$). Это свидетельствует в пользу предположения о том, что изменение концентрации аскорбиновой кислоты в мозге диабетиков может способствовать развитию психопатологии. В печени концентрация аскорбиновой кислоты понижена при стрептозотоциновом диабете (на 17%; $p < 0,001$), но повышена при острой гипергликемии (на 24%; $p < 0,01$). Анализ полученных данных позволяет высказать гипотезу о том, что гипергликемия ингибирует секрецию аскорбиновой кислоты из печени в кровь у крыс и транспорт аскорбиновой кислоты через кишечную стенку в кровь у людей.

The author hypothesizes a probable causative role of alteration of ascorbic acid concentration in the brain in the development of mental disease in diabetics. In order to verify this hypothesis, ascorbic acid was measured in the brain cortex of rats 21 days after induction of streptozotocin diabetes or 1 h after intraperitoneal injection of glucose in a dose of 5 g/kg. Ascorbic acid level was increased both in diabetes (456 ± 26 μ g/g tissue versus 415 ± 37 μ g/g in the control, $p < 0.01$) and in acute hyperglycemia (475 ± 54 μ g/g versus 406 ± 65 μ g/g in the control, $p < 0.001$). This confirmed that changed concentration of ascorbic acid in the brain can promote the development of a mental disease in diabetics. In the liver the concentration of ascorbic acid was decreased in streptozotocin diabetes (by 17%, $p < 0.001$) and increased in acute hypoglycemia (by 24%, $p < 0.01$). The findings permit us to hypothesize that hypoglycemia inhibits the production of ascorbic acid from the liver to the blood in rats and impedes the transport of ascorbic acid through the gut wall into the blood in humans.