

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ. 1995

УДК 616-018.1-02:577.175.4441-07

Т. С. Саатов, Ф. Я. Гулямова, Г. У. Усманови

УЧАСТИЕ ГАНГЛИОЗИДОВ В СВЯЗЫВАНИИ ТИРОКСИНА ПЛАЗМАТИЧЕСКИМИ МЕМБРАНАМИ

Институт биохимии (дир. – член-корр. АН Республики Узбекистан Т. С. Саатов)
АН Республики Узбекистан, Ташкент

Необходимым условием реализации эффекта гормона является наличие рецептора в реагирующих клетках. Известно, что рецепторы гормонов щитовидной железы локализованы преимущественно внутриклеточно – в ядерном хроматине, митохондриях, цитозоле [1]. Однако тиреоидные гормоны – тироксин (T_4) и трийодтиронин (T_3), представляющие собой гидрофобные соединения, обладающие высокой мембранотропностью и способны оказывать значительное влияние на функцию мембран клеток. К настоящему времени обнаружены специфические участки связывания для T_4 и T_3 на плазматических мембранах ПМ некоторых видов клеток. Показана зависимость гормонального связывания от состава фосфолипидов и жирных кислот ПМ [5, 7].

Ключевым моментом в эффекте тиреоидных гормонов на уровне мембран, безусловно, является модификация, которой подвергаются мембранные липиды. Преимущественная локализация ганглиозидов на наружной поверхности ПМ, а также такие уникальные свойства их молекулы, как большое структурное разнообразие углеводных цепей, предполагают, как нам кажется, их участие в связывании тиреоидных гормонов ПМ. Кроме того, было показано, что T_4 необходим для нормального метаболизма моносиалоганглиозидов при созревании клеток [10].

Материалы и методы

В экспериментах использовали половозрелых крыс-самцов линии Вистар массой тела 150-250 г.

Выделение высокоочищенных препаратов ПМ печени и мозга крыс проводили модифицированными нами методами В. Л. Воейкова [2] и К. Krishnan и Р. Balagam [9]. Чистоту препаратов мембран определяли по увеличению активности маркерных ферментов Na^+ , K^+ -АТФазы, Mg^{2+} -АТФазы, 5'-нуклеотидазы и аденилатциклазы в сравнении с гомогенатом. Подробное описание метода выделения очищенных ПМ из тканей печени и мозга и результаты определения чистоты полученных препаратов представлены в статье Я. Х. Туракулова и соавт. [5].

Анализ связывания меченого гормона с препаратами мембран проводили по методу J. Gharbi-Chini и I. Torresani [7]. Константы ассоциации (K_a) и максимальную связывающую емкость (МСЕ) рецепторов рассчитывали по кривой Скетчарда [5].

Изучение связывания T_4 с различными фракциями ганглиозидов, в опытах *in vitro* проводили путем инкубации фракций, выделенных тонкослойной хроматографией (ТСХ), в среде, содержащей 10 мкл ^{14}C - T_4 (0,0001 мКи), в течение 1 ч, после чего их отделяли от несвязавшегося гормона. Ганглиозиды, связанные с меткой, использовали для подсчета радиоактивности. В опытах *in vivo* крысам вводили ^{14}C - T_4 из

расчета 0,05 мКи на 100 г массы тела, животных забивали через 4 ч.

Ганглиозиды из тканей экстрагировали по методу P. Folch и соавт. [6] с собственными модификациями. Очистку выделенных ганглиозидов производили хроматографией на сефадексе G-25 и на ДЭАЭ-целлюлозе, затем подвергали диализу и лиофилизировали. О количестве выделенных ганглиозидов судили по содержанию в них сиаловой кислоты, которое определяли перйодат-резорциновым методом. Разделение ганглиозидов на фракции осуществляли методом ТСХ по Э. В. Дятловицкой [3]. Идентификацию выделенных фракций ганглиозидов проводили сравнением значений их R_f с этим показателем фракций ганглиозидов мозга быка ("Serva", Германия), а также коммерческих фракций ганглиозидов ("Sigma", США).

Все полученные результаты обрабатывали, используя критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Связывание меченого T_4 высокоочищенными препаратами ПМ клеток печени и мозга крыс было насыщаемым и специфическим [5]. Анализ в координатах Скетчарда (рис. 1) выявил по 2 сайта связывания гормона в мембранах как печени, так и мозга крыс. Первый центр связывания имел высокое сродство к T_4 и низкую емкость, а второй – низкую аффинность и более высокую емкость. Показано, что K_a высокоаффинного сайта в мембранах печени выше, чем в мембранах мозга (соответственно $1,8 \pm 0,03$ и $1,3 \pm 0,02$). Полученные данные коррелируют с параметрами связывания T_3 ядерными сайтами клеток анало-

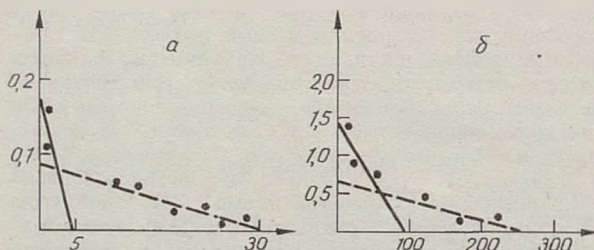


Рис. 1. Графики Скетчарда по связыванию ^{125}I - T_4 с очищенными ПМ печени (а) и мозга (б) крыс, инкубированными в стандартных условиях с меченым T_4 и возрастающими концентрациями стабильного T_4 .

K_1 (сплошная линия) – K_a высокоаффинного сайта; K_2 (пунктирная линия) – K_a низкоаффинного сайта; МСЕ₁ и МСЕ₂ – максимальная связывающая емкость соответствующих сайтов: а: $K_1 = 1,8 \pm 0,03 \times 10^9 M^{-1}$, МСЕ₁ = $5,0 \pm 0,7$ пмоль на 1 мг белка, $K_2 = 0,12 \pm 0,01 \times 10^9 M^{-1}$, МСЕ₂ = $38,6 \pm 7,3$ пмоль на 1 мг белка; б: $K_1 = 1,3 \pm 0,02 \times 10^9 M^{-1}$, МСЕ₁ = $2,5 \pm 0,7$ пмоль на 1 мг белка, $K_2 = 0,2 \pm 0,02 \times 10^9 M^{-1}$, МСЕ₂ = $28,0 \pm 8,1$ пмоль на 1 мг белка.

По оси ординат – отношение связанного ^{125}I - T_4 с ПМ к свободному; по оси абсцисс – концентрация T_4 (в пг на 100 мкг белка ПМ).

гичных тканей. По-видимому, мембранное связывание обеспечивает транспорт, накопление и обмен тиреоидных гормонов.

Мембранные рецепторы T_4 могут также иметь важное значение в процессе узнавания клетки гормоном. В этом плане представляло интерес изучение связывания меченого гормона с ганглиозидами ПМ.

Полученные данные, представленные в виде диаграмм на рис. 2, указывают на тканеспецифичность в поглощении меченого гормона. Так, ганглиозиды мембран печени связывали метку активнее, чем ганглиозиды мембран мозга крыс, за исключением дисиалоганглиозидов G_{D1b} и G_{D3} . Следует отметить, что во всех экспериментах наблюдалось максимальное связывание гормона с ганглиозидом G_{M3} , причем оно было наиболее значительным в опытах с ПМ печени. По-видимому, это различие связано с более высоким процентным содержанием фракции G_{M3} в мембранах печени.

С целью уточнения полученных результатов были проведены эксперименты по изучению включения ^{14}C - T_4 во фракции ганглиозидов *in vivo* (рис. 3).

Наибольшее включение метки для печени наблюдалось во фракциях G_{D1a} , G_{M1} , G_{M3} . При исследовании связывания гормона с ганглиозидами мембран печени показано, что общее включение метки приблизительно на порядок выше по сравнению со связыванием в мембранах мозга. Распределение же меченого гормона по фракциям ганглиозидов также показало максимальное связывание ^{14}C - T_4 с ганглиозидом G_{M3} . Включение метки во фракции моносиалоганглиозидов, а также во фракцию G_{D1a} в клетках печени аналогично результатам опытов *in vitro* значительно превышало ее включение в ганглиозиды мембран мозга.

При сравнении полученных в опытах *in vivo* и *in vitro* данных с количественным определением состава ганглиозидов печени и мозга крыс (см. таблицу) отмечается определенная корреляция между содержанием ганглиозида и связыванием им меченого гормона.

Однако, что касается ганглиозида G_{M3} , процентное содержание которого относительно невелико, а связывающая способность значительно превышает таковую для других фракций, то, видимо, он играет немаловажную роль в мембранной рецепции T_4 .

Возможная роль ганглиозида G_{M3} заключается либо в связывании T_4 с последующей передачей гормона на рецептор, либо в том, что он, связываясь с T_4 , конформационно преобразует фосфолипидное микроокружение рецептора, приводящее к его активации. Не исключено, что этот ганглиозид является составляющей частью рецепторного комплекса, как в случае тиреотропного гормона [4].

С. Накотогі [8] показал, что ганглиозиды, внедряясь керамидным остатком в белки, могут регулировать их рецепторную функцию. При этом углеводные цепочки молекул ганглиозида, как антенны, направлены к поверхности клеточной мембраны и, по-видимому, первыми вза-

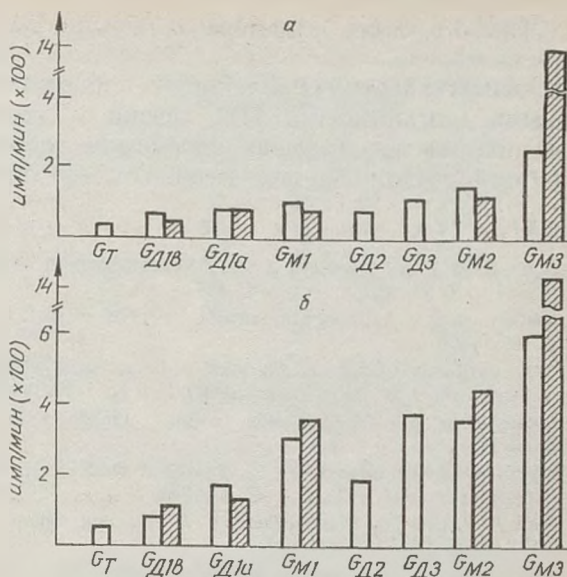


Рис. 2. Включение меченого T_4 во фракции ганглиозидов ПМ печени (заштрихованные столбики) и мозга (светлые столбики) *in vitro*.

$a - ^{125}I=T_4$; $b - ^{14}C=T_4$.

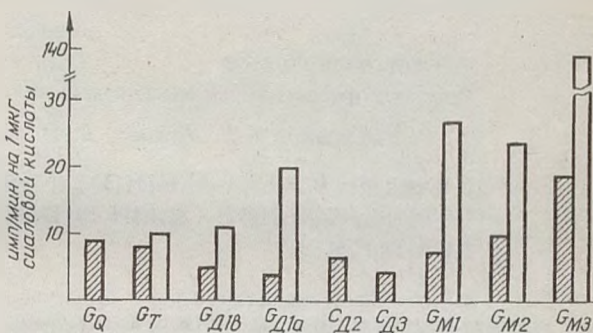


Рис. 3. Связывание $^{14}C=T_4$ отдельными фракциями ганглиозидов ПМ печени (светлые столбики) и мозга (заштрихованные столбики) *in vivo*.

имодействуют с лигандом. Таким образом, можно с определенной долей вероятности предположить, что ганглиозид G_{M3} , расположенный на поверхности ПМ вблизи рецепторного белка или, возможно, будучи связанным с ним, образует "ловушку" для T_4 и обеспечивает взаимодействие гормона с мембранным рецептором.

Выводы

1. Выявлены два сайта связывания T_4 очищенными ПМ печени и мозга крыс, причем K_a высо-

Содержание индивидуальных ганглиозидов в печени и мозге крыс (в мкг сиаловых кислот на 1 г нативной ткани; $n = 8$)

| Фракция ганглиозидов | Печень | Мозг |
|----------------------|------------------|------------------|
| G_Q | Следы | 375.2 ± 29.5 |
| G_T | 50.5 ± 6.1 | 355.6 ± 25.6 |
| G_{D1b} | 14.2 ± 1.3 | 156.8 ± 11.4 |
| G_{D1a} | 71.7 ± 6.2 | 823.2 ± 67.7 |
| G_{D2} | - | 163.4 ± 15.4 |
| G_{D3} | - | 114.8 ± 12.1 |
| G_{M1} | 93.4 ± 9.3 | 229.6 ± 20.3 |
| G_{M2} | 67.6 ± 6.5 | 249.2 ± 19.4 |
| G_{M3} | 202.3 ± 21.2 | 341.6 ± 24.2 |

коэффинного сайта в мембранах печени была несколько выше.

2. Анализ связывания меченого T_4 с индивидуальными ганглиозидами ПМ печени и мозга крыс показал максимальное связывание гормона с ганглиозидом G_{M3} в опытах *in vivo* и *in vitro*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Верецагина Т. В., Трапкова А. А. // Успехи соврем. биол. — 1984. — Т. 97, вып. 3. — С. 447-457.
2. Воейков В. Л. // Биоорг. химия. — 1976. — Т. 2. — С. 1672-1679.
3. Препаративная биохимия липидов / Бергельсон Л. Д., Дятловицкая Э. В., Молотковский Ю. Г. и др. — М., 1981.
4. Проказова Н. В. // Успехи биол. химии. — 1982. — Т. 23. — С. 40-60.
5. Туракулов Я. Х., Саатов Т. С., Гулямова Ф. Я. и др. // Биохимия. — 1991. — Т. 56. — С. 839-845.
6. Folch P. J., Lees M., Sloane-Stanley C. H. // J. Biol. Chem. — 1957. — Vol. 226. — P. 497-509.
7. Gharbi-Chili J., Torresani I. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1979. — Vol. 88. — P. 170-177.
8. Nakomori S.-I. // Ann. Rev. Biochem. — 1981. — Vol. 50. — P. 733-764.
9. Krishnan K. S., Balaram P. // Exp. Cell Res. — 1976. — Vol. 101. — P. 299.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.831.41]+616.432+616.681]-008.6-02:547.466.3

Е. В. Науменко, А. В. Жукова, Л. И. Серова

УЧАСТИЕ ГАММА-АМИНОМАСЛЯНОЙ КИСЛОТЫ В МЕХАНИЗМАХ ОБРАТНОЙ ОТРИЦАТЕЛЬНОЙ СВЯЗИ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-СЕМЕННИКОВОГО КОМПЛЕКСА¹

Лаборатория генетических основ нейроэндокринной регуляции (зав. — проф. Е. В. Науменко) Института цитологии и генетики (дир. — акад. РАН В. К. Шумный) Сибирского отделения РАН, Новосибирск

Известно, что гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) участвует в регуляции секреции многих аденогипофизарных гормонов [2, 9]. Кроме того, ГАМКергические механизмы могут вовлекаться в регуляцию тестостеронзависимого агрессивного [5] и полового [8] поведения. Значительное число работ свидетельствует, что ГАМК и ее рецепторы способны принимать участие в регуляции секреции лютеинизирующего гормона (ЛГ). Однако ее роль в этом процессе не вполне ясна, так как, по данным разных авторов, ГАМК оказывает на выделение ЛГ как ингибирующие, так и активирующие влияния [3, 12].

Еще меньше известно о роли ГАМК и ее рецепторов в регуляции секреции ЛГ механизмом обратной отрицательной связи, изучение которого проводится на двусторонне кастрированных крысах [3]. Однако такая модель дает возможность исследовать лишь отдельное звено этого механизма, регулирующего гипоталамо-гипофизарно-семенниковый комплекс (ГГСК). Что же касается изучения нейрохимической регуляции целостной системы обратной отрицательной свя-

10. Noguchi T., Tetsuro S. // J. Neurochem. — 1986. — Vol. 47 — P. 1785-1792.

Поступила 25.08.94

T. S. Saatov, F. Ya. Gulyamova and G. U. Usmanova — CONTRIBUTION OF GANGLIOSIDES TO THYROXIN BINDING WITH PLASMA MEMBRANES

Summary. Besides intracellular receptors of thyroid hormones, specific binding sites for T_4 and T_3 were detected on plasma membranes (PM) of some cells and a relationship between membrane reception and lipid composition of membranes shown. The parameters of ^{125}I - T_4 binding to highly purified PM of hepatic and cerebral cells of rats were studied. The hepatic and cerebral cellular membranes were found to contain two sites of hormone binding each, one of these sites being characterized by a high affinity and low capacity, and the other by low affinity and a higher binding capacity. The association constant of highly affine site of hepatocyte membranes was found to be higher than that of brain cell membranes. T_4 membranous receptors may be significant in the process of cell "recognition" by the hormone. *In vivo* and *in vitro* experiments with ^{125}I and ^{14}C -labeled thyroxin in ganglioside fractions showed appreciable binding of the hormone to G_{M3} fraction, this evidently pointing to participation of this ganglioside in T_4 interaction with membrane receptor. It is possible that gangliosides situated on membranous surface are components of, or function as receptors.

зи, то для этой цели более адекватным является использование односторонне кастрированных крыс. У таких животных компенсация недостаточности андрогенов обусловлена стимуляцией обратной отрицательной связи, а не введением экзогенных стероидов. Кроме того, уровень тестостерона в периферической крови более адекватно отражает состояние данного механизма, чем уровень гонадотропинов [7]. Однако роль ГАМК и ее рецепторов в регуляции целостного механизма обратной отрицательной связи ГГСК, насколько нам известно, совершенно не изучалась. Это и явилось целью настоящей работы.

Материалы и методы

В опытах использовали ложнопериоперированных и односторонне кастрированных 3-месячных самцов крыс линии Вистар массой тела 200-220 г. Животные выращены в виварии Института цитологии и генетики СО РАН при естественном освещении, пищу и воду получали без ограничений.

Крыс оперировали под нембуталовым наркозом (35 мг на 1 кг массы тела), удаляя левый семенник, и декапитуировали через различное время после введения препаратов или соответствующего количества физиологического раствора. Ложнопериоперированным животным делали только надрез (длиной 1 см) мошонки и накладывали шов.

Для повышения в организме уровня ГАМК применяли ингибитор α -кетоглутарат-ГАМК-трансминазы — аминок-

¹Исследования, описанные в настоящей работе, частично были проведены благодаря гранту № RAJ 000, полученному от Международного научного фонда.