

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 КОМПЛЕКСА<sup>1</sup>

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  $\alpha$ -кетоглутарат-ГАМК-трансминазы — аминок-

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

Влияние изменения в организме содержания ГАМК на компенсаторное повышение уровня тестостерона в крови после односторонней кастрации

Препарат, доза	Время после кастрации, ч	Уровень тестостерона, нг/мл ( $M \pm m$ )	Число животных	p
Контроль	0	1,25 ± 0,28	7	
Контроль	24	0,34 ± 0,02	7	< 0,01*
Контроль	48	1,33 ± 0,29	7	
АОУК, 20 мг/кг	48	0,59 ± 0,12	7	< 0,05**
ТСК, 5 мг/кг	48	3,18 ± 0,32	5	< 0,001**
Контроль	0	1,36 ± 0,18	18	
Контроль	12	0,80 ± 0,17	7	< 0,05*
Контроль	24	1,12 ± 0,17	7	
ТСК, 5 мг/кг	24	2,27 ± 0,50	8	< 0,05**

Примечание. Здесь и в табл. 2 и 3: одна звездочка — по сравнению с 0 ч, две — по сравнению с контролем в то же время.

Таблица 2

Влияние стимуляции ГАМКергических рецепторов на компенсаторное повышение уровня тестостерона в крови после односторонней кастрации

Препарат, доза	Время после кастрации, ч	Уровень тестостерона, нг/мл ( $M \pm m$ )	Число животных	p
Контроль	0	1,04 ± 0,28	6	
Контроль	24	0,38 ± 0,08	10	< 0,05*
Контроль	48	1,27 ± 0,28	6	
Мусцимол, 7 мг/кг	48	0,63 ± 0,09	8	< 0,05**
Контроль	0	1,25 ± 0,29	7	
Контроль	24	0,34 ± 0,02	7	< 0,01**
Контроль	48	1,33 ± 0,29	7	
Баклофен, 5 мг/кг	48	2,49 ± 0,37	6	< 0,05**

Таблица 3

Влияние блокады ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов на компенсаторное повышение уровня тестостерона в крови после односторонней кастрации в зимний (А) и летний (Б) сезоны года

Препарат, доза	Время после кастрации, ч	Уровень тестостерона, нг/мл ( $M \pm m$ )	Число животных	p
А. Контроль	0	0,63 ± 0,11	5	
Контроль	24	0,29 ± 0,07	5	< 0,05*
Контроль	48	0,48 ± 0,06	12	
Бикукуллин, 1,8 мг/кг	48	0,87 ± 0,16	8	< 0,05**
Б. Контроль	0	0,95 ± 0,22	5	
Контроль	6	0,26 ± 0,07	5	< 0,02*
Контроль	12	1,01 ± 0,11	5	
Бикукуллин, 1,8 мг/кг	12	1,58 ± 0,20	4	< 0,05**

Таким образом, ГАМК оказывает отчетливое ингибирующее влияние на механизм обратной отрицательной связи, регулирующий функцию ГГСК. Возникал вопрос о роли в этом процессе ГАМКергических рецепторов. Для его выяснения гемикастрированным крысам вводили препараты, активирующие рецепторы к ГАМК.

Введение мусцимола, возбуждающего ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы, сопровождалось задержкой компенсаторного повышения уровня тестостерона в крови по сравнению с контрольными животными, причем такой эффект уже наблюдался после введения ничтожно малой (7 мг/кг) дозы этого препарата (табл. 2).

снуксусную кислоту (АОУК, фирма "Sigma") в дозе 20 мг на 1 кг массы тела животного. Для понижения уровня ГАМК вводили ингибитор глутаматдекарбоксилазы — тиосемикарбазит (ТСК, фирма "Sigma") в дозе 5 мг/кг. Возбуждение ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов осуществляли с помощью мусцимола (фирма "Sigma") в дозе 7 мг/кг, а ГАМК<sub>B</sub> рецепторов — с помощью баклофена (фирма "Sigma") в дозе 5 мг/кг. ГАМК<sub>A</sub>-рецепторы блокировали метиловым бисукуллином (фирма "Sigma") в дозе 1,8 мг/кг. Дозы используемых препаратов, оказывающих какое-либо влияние на компенсаторное повышение в крови уровня тестостерона после гемикастрации и не влияющих на состояние и поведение животных, подбирали в предварительных опытах. Препараты растворяли в физиологическом растворе и вводили внутривентрикулярно во время наибольшего снижения уровня тестостерона в периферической крови, вызванного удалением семенника. Контрольным животным в тех же условиях вводили аналогичные объемы физиологического раствора.

Тестостерон в плазме периферической крови определяли радиоиммунологическим методом, применяя высокоспецифическую антисыворотку и <sup>3</sup>H-тестостерон (фирма "Amersham"). Статистическую обработку результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента с учетом неоднородности дисперсий в исследуемых группах.

## Результаты и их обсуждение

Изучение участия ГАМК и ее рецепторов в механизмах обратной отрицательной связи ГГСК представляет известные трудности. Они обусловлены тем, что сезонные факторы и сезонные ритмы оказывают влияние не только на исходный уровень тестостерона в крови интактных животных, но и на его динамику после односторонней кастрации [1]. Летом, когда проводились основные исследования, содержание тестостерона в крови значительно выше, чем зимой, а компенсация пониженного в результате удаления семенника уровня тестостерона в крови происходит значительно быстрее. Однако даже в течение одного сезона можно наблюдать различия в скорости снижения уровня тестостерона в крови после гемикастрации, что приводит к необходимости проведения дополнительных контрольных экспериментов.

В наших опытах, проведенных в июле, уровень тестостерона, снизившийся более чем в 3 раза через 24 ч после односторонней кастрации, достоверно повышался до исходного через 48 ч после операции. Повышение в организме уровня ГАМК в результате введения АОУК на пике снижения в крови содержания мужского полового гормона отчетливо ингибировало компенсаторное его повышение (табл. 1).

Противоположные результаты были получены на фоне пониженного в организме содержания ГАМК. Оказалось, что снижение ее концентрации после введения ТСК сопровождается достоверным усилением компенсаторного повышения уровня тестостерона в крови, который через 48 ч после гемикастрации превысил более чем в 2 раза исходный уровень. Повторные эксперименты в августе дали сходные результаты: снижение уровня ГАМК на фоне уменьшения в крови содержания мужского полового гормона через 12 ч после операции сопровождалось через 24 ч усилением компенсаторного подъема уровня тестостерона в периферической крови по сравнению с его уровнем у контрольных животных (см. табл. 1).

Противоположный эффект был обнаружен после введения специфического блокатора ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов бикукуллина. Повышение уровня тестостерона после его снижения в крови, вызванного односторонней кастрацией, значительно усиливалось. Такие результаты были получены как в зимний, так и в летний сезоны (табл. 3).

В отличие от возбуждения ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов активация Б-типа рецепторов баклофеном сопровождалась усилением компенсаторного повышения уровня тестостерона в крови в 2 раза (см. табл. 2).

Таким образом, рецепторы к ГАМК влияют на механизм обратной отрицательной связи, регулирующий функцию ГГСК, однако характер действия разных типов рецепторов противоположный: в то время как возбуждение ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов сопровождается угнетением, возбуждение ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов приводит к усилению компенсаторного повышения уровня тестостерона в периферической крови после его снижения, вызванного односторонней кастрацией.

Поскольку в настоящей работе препараты вводили внутривенно, а все они хорошо проходят гематоэнцефалический барьер, нельзя сделать определенного заключения о локализации ГАМКергических рецепторов, связанных с регуляцией ГГСК. Помимо того, что ГАМК рассматривается как тормозный медиатор в центральной нервной системе, показано, что ГАМК играет роль нейротрансмиттера и в периферической нервной системе [6]. Кроме того, нельзя исключить прямого действия ГАМК на гонады, поскольку ГАМК обнаружена в половых железах, а большая плотность ее рецепторов — на мембранах клеток половых желез [4, 11]. Более того, относительно недавно выявлено, что ГАМК способна регулировать продукцию андрогенов в семенниках у крыс [10]. Поэтому только специальные эксперименты, в которых будет дифференцировано влияние возбуждения ГАМКергических механизмов головного мозга и периферии, помогут выяснить относительную роль рецепторов к ГАМК, расположенных в центральной и периферической нервной системе, в регуляции функции ГГСК механизмом обратной отрицательной связи.

## Выводы

1. Увеличение содержания ГАМК в организме сопровождается угнетением, а ее снижение — усилением компенсаторного повышения уровня тестостерона в периферической крови после односторонней кастрации.

2. Возбуждение ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов приводит к угнетению, а возбуждение ГАМК<sub>B</sub>-рецепторов — к усилению компенсаторного повышения уровня тестостерона в периферической крови после его снижения, вызванного гемикастрацией.

3. ГАМКергические механизмы способны принимать участие в регуляции функции ГГСК механизмом обратной отрицательной связи.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Науменко Е. В., Осадчук А. В., Серова Л. И., Шишкина Г. Т. Генетико-физиологические механизмы регуляции функций семенников. — Новосибирск, 1983.
2. Anderson R. A., Mitchell R. // J. Endocr. — 1986. — Vol. 108. — P. 1-8.
3. Donoso A. O. // Neuroendocrinology. — 1988. — Vol. 48. — P. 130-137.
4. Erdö S. L., Laslo A. // J. Neurochem. — 1984. — Vol. 42. — P. 1464-1467.
5. Hang M., Simler S., Ciesielski L. et al. // Physiol. and Behav. — 1984. — Vol. 32. — P. 767-770.
6. Janssen K. R., Mirsky R., Dennison M. E., Burstock G. // Nature. — 1979. — Vol. 281. — P. 71-74.
7. Naumenko E. V., Shishkina G. T. // Neuroendocrinology. 1978. — Vol. 26. — P. 359-366.
8. Naumenko E. V., Serova L. I. // Pharmacol. Biochem. Behav. — 1991. — Vol. 4. — P. 287-290.
9. Racagni G., Apud J. A., Cocchi D. et al. // Life Sci. 1982. — Vol. 31. — P. 823-838.
10. Ritta M. N., Campos M. B., Calandra R. S. // Ibid. — 1987. — Vol. 40. — P. 791-798.
11. Tanaka Ch. // Ibid. — 1985. — Vol. 37 — P. 2221-2235.
12. Wilson C. A., James M. D., Leigh A. J. // Neuroendocrinology. — 1990. — Vol. 52. — P. 354-360.

Поступила 28.07.94

Ye. V. Naumenko A. V. Zhukova and L. I. Serova — CONTRIBUTION OF  $\gamma$ -AMINO BUTYRIC ACID TO THE MECHANISM OF THE NEGATIVE FEEDBACK OF THE HYPOTHALAMO-HYPOPHYSEO-GONADAL COMPLEX

**Summary.** The role of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) and its receptors in the regulation of negative feedback mechanisms of the integral hypothalamo-hypophyseo-gonadal complex was studied in sham-operated and unilaterally castrated Wistar rats. An increase of GABA content in the body by aminoacetic acid, an inhibitor of GABA-transaminase, was associated with a suppression of the compensatory rise of testosterone level in the peripheral blood after its two- or threefold drop caused by castration, whereas a reduction of GABA content with thiosemicarbaside, an inhibitor of glutamate decarboxylase, was paralleled by a more intensive compensatory increase of testosterone level. All GABA receptors participate in its action. Stimulation of GABA receptors with muscimol suppressed, and their blocking with bicucullin intensified the compensatory increase of testosterone level following hemicastration. At the same time, stimulation of GABA<sub>B</sub> receptors with baclophene was paralleled by a more intensive compensatory rise of blood testosterone level. The authors come to a conclusion that GABAergic systems contribute to regulation of the function of the hypothalamo-hypophyseo-gonadal complex as a negative feedback mechanism.