

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1995

УДК 616.357:577.175.444:015.4.076.9

Я. Х. Туракулов, С. Н. Далимова, И. Р. Камалиева

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ТИРОКСИНА И ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО ТИРОКСИНСВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА НА СИНТЕЗ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ БЕЛКОВ ПЕЧЕНИ И ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Лаборатория биохимии гормонов (зав. — акад. АН Республики Узбекистан Я. Х. Туракулов) Института биохимии (дир. — член-корр. АН Республики Узбекистан проф. Т. С. Саатов) АН Республики Узбекистан, Ташкент

В результате многочисленных исследований [20–22] сложилось представление о том, что основной мишенью действия тиреоидных гормонов является генетический аппарат клетки. Однако, по имеющимся данным, ядро клетки является не единственной точкой приложения гормонов щитовидной железы, так как хорошо известно действие тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3) на дыхание митохондрий, окислительное фосфорилирование и свойства мембран митохондрий [19, 23]. Кроме того, в последние годы в цитоплазме различных органов обнаружено большое количество тиреоидгормонсвязывающих белков, роль которых в реализации ядерного и митохондриального действия тиреоидных гормонов в литературе оценивается неоднозначно [1, 10, 11]. Имеющиеся в литературе сведения касаются главным образом роли цитоплазматических белков в связывании и транспорте гормонов щитовидной железы. В то же время действие этих белков на внутриклеточные биохимические и физиологические процессы мало изучено.

Изучение влияния T_4 - и T_3 -связывающих белков на процессы, происходящие в ядре и митохондриях, представляется важным для более полного понимания механизмов действия тиреоидных гормонов. Важным является также изучение тканеспецифического влияния T_4 и белков, связывающихся с ним, на эти процессы в различные периоды развития, так как известно, что специфичность гормонального эффекта определяет не гормон, а сама ткань-мишень.

Целью работы явилось сравнительное изучение влияния физиологических концентраций T_4 и обнаруженного ранее нами [4, 5] цитоплазматического T_4 -связывающего белка (модулятор действия T_4 — МДТ $_4$) на синтез митохондриальных белков печени и головного мозга крыс разного возраста.

Материалы и методы

Использовали 20-дневные эмбрионы, 7, 20, 45 и 90-дневных крысят линии Вистар. Митохондрии и цитоплазматический МДТ $_4$ выделяли из печени и головного мозга интактных и гипертиреоидных эмбрионов и крысят разного возраста по ранее описанному методу [6, 12]. Очистку МДТ $_4$ осуществляли с помощью последовательной хроматографии на T_4 -сефарозе CL-4B, сефакиле S-200 и сефадексе G-50 [6]. Электрофорез препаратов модулятора и стандартных белков (бывший сывороточный альбумин, химотрипсиноген, цитохром C) в присутствии додецилсульфата натрия проводили в 10–15% полиакриламидном геле [13]. Гипертиреоидное состояние у эмбрионов и 7-дневных крысят вызывали введением L-тироксина (фирма "Reanal") в дозе 0,5 мкг на 1 г массы крысам на 13-й день беременности в течение 7 дней. Гипертиреоз у

20, 45 и 90-дневных крысят вызывали введением гормона в течение недели в дозе 1 мкг на 1 г массы за 7 дней до забоя.

О синтезе белков в митохондриях печени и головного мозга судили по включению L-[^{14}C]-лейцина в белки митохондрий. Изолированные митохондрии 1–2 мг/мл инкубировали с 250 мкл белоксинтезирующей смеси, содержащей 40 мМ трис-HCl (pH 6,9), 30 мМ KCl, 20 мМ калий-фосфатного буфера, 20 мМ $MgCl_2$, 10 мМ фосфоэнолпирувата, 60 мкг/мл пируваткиназы, 10 мМ α -кетоглутарата, 120 мМ маннитола, 2 мг/мл БСА, 4 мМ АГФ, 0,2 мМ смеси немеченных аминокислот, 0,01 мКи/мл L-[^{14}C]-лейцина и 100 мкг (100 мкл) МДТ $_4$. Время инкубации 50 мин при 36°C. После инкубации во все пробы добавляли по 500 мкл 10% охлажденной трихлоруксусной кислоты (ТХУ), затем осадки переносили на миллипоровые фильтры (фирмы "Synpor"), после промывания фильтров 5% ТХУ и 85% этанолом подсчитывали радиоактивность проб на сцинтилляционном счетчике "Rack Beta-1217" LKB (Швеция). В качестве контроля на отсутствие загрязнения митохондрий белоксинтезирующей системой цитоплазмы использовали циклогексимид (0,5 мМ) и пуромицин (50 мкМ). Белок в пробах определяли по методу Лоури [16].

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 представлены результаты влияния физиологической концентрации T_4 и МДТ $_4$ на синтез митохондриальных белков печени крыс разного возраста. Чистота митохондриальной белоксинтезирующей системы проверялась добавлением в систему циклогексимида и пуромицина — ингибиторов цитоплазматического и митохондриального синтеза белков. Циклогексимид не оказывает существенного влияния на включение метки в белки митохондрий, тогда как пуромицин примерно на 60–70% подавляет этот процесс в митохондриях печени крыс всех изученных возрастов. T_4 в дозе 10^{-8} М почти не влияет на синтез митохондриальных белков. Это согласуется с имеющимися данными [2] о том, что в опытах *in vitro* T_4 в концентрациях 10^{-9} – 10^{-5} М не оказывает видимого действия на биохимические процессы в митохондриях.

Из данных литературы известно, что для реализации физиологического действия гормонов [8] на митохондрии необходимо участие цитоплазматических белковых факторов. Одним из таких факторов является белок, обнаруженный японскими авторами [12] и нами [4] в цитоплазме печени и головного мозга крыс, условно названный модулятором действия тироксина (на основании способности белка модулировать ряд эффектов гормона). С помощью методов гель-фильтрации, электрофоретических методов и анализа аминокислотного и липидного составов модулятор был идентифицирован как гликопротеин с мол. м. 24 кДа, способный связывать меченный ^{125}I - T_4 в чрезвычай-

Таблица 1

Влияние T_4 и МДТ $_4$ на синтез белков (включение ^{14}C -лейцина в белки в имп/мин на 1 мг белка) митохондрий печени крыс разного возраста ($n = 10$; $M \pm m$)

Условие эксперимента	Эмбрионы 20-дневные	Крысята в возрасте			
		7 дней	20 дней	45 дней	90 дней
Контроль	1922 $\pm$ 107	2294 $\pm$ 145	2967 $\pm$ 190	3271 $\pm$ 206	3310 $\pm$ 245
Циклогексимид	1758 $\pm$ 112	1985 $\pm$ 167	2871 $\pm$ 201	3061 $\pm$ 210	3258 $\pm$ 230
Пурамицин	673 $\pm$ 41**	1145 $\pm$ 93**	891 $\pm$ 35**	1309 $\pm$ 118**	1159 $\pm$ 78**
T_4 (10^{-8} М)	2079 $\pm$ 127	2501 $\pm$ 161	3225 $\pm$ 201	3565 $\pm$ 290	3674 $\pm$ 314
МДТ $_4$ (печень, норма) + T_4	2575 $\pm$ 118**	3895 $\pm$ 210**	6379 $\pm$ 271**	8101 $\pm$ 213**	9750 $\pm$ 220**
МДТ $_4$ (печень, гипертиреоз)	2402 $\pm$ 143*	3785 $\pm$ 174**	6021 $\pm$ 254**	7752 $\pm$ 203**	8837 $\pm$ 359**
МДТ $_4$ (головной мозг, гипертиреоз)	2095 $\pm$ 97	2375 $\pm$ 207	3150 $\pm$ 290	3501 $\pm$ 190	3575 $\pm$ 273

Примечание. Здесь и табл. 2 достоверность различий по сравнению с контролем: одна звездочка — $p > 0,01$, две — $p > 0,001$.

Таблица 2

Влияние T_4 и МДТ $_4$ на синтез белков (включение ^{14}C -лейцина в белки в имп/мин на 1 мг белка) митохондрий головного мозга крыс разного возраста ($n = 10$; $M \pm m$)

Условие эксперимента	Эмбрионы 20-дневные	Крысята в возрасте			
		7 дней	20 дней	45 дней	90 дней
Контроль	1585 $\pm$ 78	1945 $\pm$ 29	2097 $\pm$ 101	2358 $\pm$ 168	2639 $\pm$ 175
Циклогексимид	1430 $\pm$ 61	1875 $\pm$ 32	1911 $\pm$ 93	2178 $\pm$ 130	2501 $\pm$ 150
Пурамицин	792 $\pm$ 30**	884 $\pm$ 25**	1165 $\pm$ 76**	1025 $\pm$ 85**	1256 $\pm$ 69**
T_4 (10^{-8} М)	1701 $\pm$ 39	2107 $\pm$ 93	2369 $\pm$ 95	2711 $\pm$ 117	2876 $\pm$ 143
МДТ $_4$ (головной мозг, норма) + T_4	3123 $\pm$ 117**	4997 $\pm$ 111**	5129 $\pm$ 221**	3193 $\pm$ 109	2917 $\pm$ 129
МДТ $_4$ (головной мозг, гипертиреоз)	2773 $\pm$ 103**	4862 $\pm$ 230**	4802 $\pm$ 175**	2758 $\pm$ 171	2770 $\pm$ 102
МДТ $_4$ (печень, гипертиреоз)	1678 $\pm$ 120	2170 $\pm$ 105	2205 $\pm$ 130	2170 $\pm$ 150	2820 $\pm$ 194

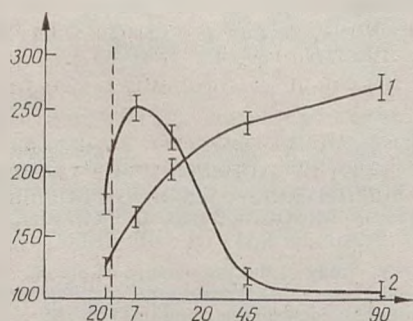
чайно низких концентрациях (K_a $1,3 \cdot 10^{10}$ М $^{-1}$) [6].

Добавление модулятора, выделенного из клеток интактных крыс всех возрастов, приводило к незначительному изменению включения метки в белки митохондрий. Совместная преинкубация физиологической концентрации T_4 с таким модулятором вызывала существенную стимуляцию биосинтеза белков митохондрий во все исследованные сроки развития, причем эта стимуляция увеличивается с возрастом животных и достигает максимума (294% стимуляции) у 90-дневных крысят. Аналогичная закономерность сохранялась и в случае, когда мо-

дулятор выделяли из печени гипертиреоидных эмбрионов и крыс. В этой серии экспериментов проводили также перекрестные эксперименты, в которых к митохондриям печени эмбрионов и крысят в среду инкубации добавляли модулятор, выделенный из клеток головного мозга гипертиреоидных крыс. Эти эксперименты показали, что МДТ $_4$, выделенный из головного мозга крыс всех изученных возрастов, почти не изменял синтеза белков митохондрий печени.

Особый интерес вызывало изучение митохондриального синтеза белков при действии T_4 и МДТ $_4$ в клетках головного мозга (табл. 2). Физиологические концентрации свободного T_4 так же, как и в печени, почти не изменяют синтеза белков в изолированных митохондриях мозга, тогда как МДТ $_4$, выделенный из клеток головного мозга интактных крыс и предварительно преинкубированный с T_4 (10^{-8} М), а также модулятор из клеток гипертиреоидных крыс стимулируют включение меченого лейцина в белки митохондрий у эмбрионов, 7- и 20-дневных крысят. В дальнейшие сроки развития стимуляция синтеза белков снижается и у 90-дневных крысят возвращается к контрольному уровню. Идентичные результаты были получены при проведении перекрестных экспериментов (митохондрии мозга + модулятор из печени гипертиреоидных крыс).

Если активность модулятора выражать в его способности изменять включение меченых аминокислот в белки митохондрий, можно проследить динамику изменений активности МДТ $_4$ в



Динамика активности МДТ $_4$ в печени (1) и головном мозге (2) крыс разного возраста.

По оси ординат — активность модулятора, изменения синтеза белков митохондрий (в % к контролю); по оси абсцисс — дни развития.

печени и головном мозге крыс в различные сроки пре- и постнатального развития крыс (см. рисунок). Из рисунка видно, что активность модулятора меняется в печени и головном мозге в зависимости от возраста по-разному. В печени повышение активности МДТ₄ прямо коррелирует с возрастом животного, а в клетках головного мозга наибольшая активность модулятора обнаруживается у эмбрионов и крысят, не достигших месячного возраста.

Полученные в этой серии результаты совпадают с литературными данными о том, что в ранние постнатальные сроки у крыс происходит максимальное связывание в цитоплазме Т₄ с соответствующими рецепторами [7, 8]. По-видимому, такая динамика обеспечивает поступление необходимого количества гормона в период, когда имеется наибольшая потребность в нем для развития мозга. Во взрослом организме чувствительность мозга к действию Т₄ снижается и, очевидно, это связано со снижением активности модулятора.

Известно, что важнейшим показателем действия тиреоидных гормонов является увеличение основного обмена, "калоригенный" эффект гормонов щитовидной железы, сопровождающийся повышенным потреблением различными тканями кислорода и увеличением в этих тканях синтеза белков [2, 18]. Но не все органы отвечают усилением энергетического метаболизма (например, ЦНС) [7]. Эти данные указывают на то, что гормоны щитовидной железы дают множественные и различные эффекты в тканях. Это различие проявляется также в ответе некоторых ферментных систем клеток. Так, при гипертиреозе активность α -глицерофосфатдегидрогеназы в печени повышается в 20 раз, при гипотиреозе активность этого фермента снижается. В то же время при гипертиреозе в мозговой ткани не наблюдается заметных изменений в активности α -глицерофосфатдегидрогеназы [14].

По мнению некоторых авторов [17], дифференцированный ответ органов на действие тиреоидных гормонов обусловлен различиями в содержании ядерных Т₃-рецепторов. Ими обнаружена высокая корреляция между метаболическим ответом разных органов на действие гормонов щитовидной железы и Т₃-связывающей емкостью ядерных рецепторов этих органов.

В то же время установлено, что в онтогенезе имеется период, когда тиреоидные гормоны абсолютно необходимы для развития мозга. Это поздний эмбриональный и неонатальный периоды жизни у людей и первые 2-3 нед постнатальной жизни у крыс, кроликов и кошек [9]. Клинически [24] и экспериментально [15] установлено, что недостаток тиреоидных гормонов в этот период приводит к структурным и функциональным изменениям ЦНС. Введение тиреоидных гормонов в этот период нормализует развитие ЦНС. Чем вызвана различная возрастная чувствительность мозга к тиреоидным гормонам, остается неясным. На основании данных литературы и результатов наших экспериментов можно предположить, что в механизме тканеспецифического влияния тиреоидных гормонов и формирования возрастной чувствительности к действию этих гормонов принимают участие цитоплазматические Т₄-связывающие белки типа модулятора.

Выводы

1. Для реализации действия физиологической концентрации Т₄ на синтез белков изолированных митохондрий печени крыс разного возраста необходимо участие цитоплазматического МДТ₄.

2. Изменение активности МДТ₄ в печени прямо пропорционально увеличению возраста крыс и совпадает с калоригенным эффектом гормона в этом органе.

3. В клетках головного мозга максимальная активность модулятора приходится на поздний эмбриональный и ранний постнатальный (до 25-го дня жизни) периоды развития крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азимова III. С., Норматов К., Умарова Г. Д., Камтаров А. И. // Биохимия. — 1985. — Т. 50, № 11. — С. 1456-1463.
2. Гасельганс А. И., Гайдина Г. А., Гольбер Л. М. и др. // Тиреоидные гормоны. — Ташкент, 1972. — С. 251-262.
3. Мицкевич М. С. // Гормональная регуляция в онтогенезе животных. — М., 1978. — С. 23-28.
4. Туракулов Я. Х., Далимова С. И. // Пробл. эндокринолог. — 1990. — Т. 36, № 5. — С. 71-75.
5. Туракулов Я. Х., Далимова С. И., Умарова Г. Д., Атаханова Б. А. // Докл. АН СССР. — 1990. — Т. 313, № 3. — С. 744-746.
6. Туракулов Я. Х., Далимова С. И., Камалиева Н. Р. // Докл. АН Респ. Узбекистан. — 1992. — № 2. — С. 47-51.
7. Dozin-Van Roy, DeNayer Ph. // FEBS Lett. — 1978. — Vol. 96. — P. 152-154.
8. Gell S. E. // Nature. — 1977. — Vol. 269. — P. 428-431.
9. Gomes C. I. // Hormones in Development. — New York, 1971. — P. 417-433.
10. Hashizume K., Suzuki S., Takeda T. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1991. — Vol. 174. — P. 1084-1089.
11. Ichikawa K., Hashizume K., Yamada T. // Endocrinology. — 1982. — Vol. 111. — P. 1803-1806.
12. Ichikawa K., Hashizume K., Kobayashi M., Yamada T. // Ibid. — 1985. — Vol. 117. — P. 1749-1758.
13. Laemmli U. K. // Nature. — 1970. — Vol. 227. — P. 680-685.
14. Lee Y. P., Lardy H. A. // J. biol. Chem. — 1965. — Vol. 240. — P. 1427-1432.
15. Legrand I. // J. Physiol. (Paris). — 1983. — Vol. 78. — P. 603-652.
16. Lowry G. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. // J. biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265-275.
17. Oppenheimer I. H. // New Engl. J. Med. — 1975. — Vol. 292. — P. 1063-1068.
18. Sokoloff L., Francis C. M., Campbell P. L. // Proc. nat. Acad. Sci. USA. — 1964. — Vol. 52. — P. 728-734.
19. Sterling K. // Endocrinology. — 1986. — Vol. 119. — P. 292-298.
20. Surks M. I., Oppenheimer I. H. // J. clin. Invest. — 1977. — Vol. 60. — P. 55.
21. Tata I. R. // Biochem. J. — 1966. — Vol. 88. — P. 604-620.
22. Tata I. R. // Nature. — 1968. — Vol. 219. — P. 331-336.
23. Verhoeven A. I., Ramer P. K., Groen A. K., Tager I. M. // Biochem. J. — 1985. — Vol. 225. — P. 183-192.
24. Wolter R., Noel P., De Cock P., Craen M. // Acta med. scand. — 1980. — Vol. 177. — Suppl. — P. 41-46.

Поступила 11.10.94

Ya. Kh. Turakulov, S. N. Dalimova, I. R. Kamaliyeva — COMPARATIVE STUDY OF THE EFFECTS OF THYROXIN AND CYTOPLASMIC THYROXIN-BINDING PROTEIN ON THE SYNTHESIS OF MITOCHONDRIAL PROTEINS OF THE LIVER AND BRAIN IN RATS OF DIFFERENT AGE

Summary. Study of the time course of protein synthesis by intact liver and brain mitochondria in rats of different age exposed to thyroxine in physiological concentrations (10^{-8} M) and cytoplasmic thyroxine-binding protein (modulator of thyroxine effect — MDT₄) showed that thyroxine did not influence protein synthesis in liver and brain mitochondria. On the other hand, MDT₄ stimulated protein synthesis, this stimulation correlating with the age of rats. In brain cells MDT₄ enhanced labeled leucine incorporation in the embryonal and early postnatal periods. MDT₄ is proposed to be involved in the mechanism of tissue-specific effect of thyroxine and in the formation of age-specific sensitivity to it.