

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 1994
УДК 616-018.1-008.962.4:577.175.531-07

Е. П. Киселева, И. И. Вашкевич, О. А. Стрельченко

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТРАНСКОРТИНА С СИНЦИТИОТРОФОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА

Лаборатория химии белковых гормонов Института биоорганической химии (дир.—член-корр. АН Беларуси О. А. Стрельченко) АН Беларуси, Минск

В плазматических мембранах клеток ряда тканей человека и животных обнаружены участки специфического связывания транскортина (кортикостероидсвязывающего глобулина, КСГ) [1, 13, 16]. Получены доказательства присутствия этого гликопротеина в клетках различных тканей человека и животных с помощью иммунохимических [20, 21, 24, 26] и биохимических [4, 8, 10, 12, 18] методов. Показано поглощение КСГ маткой, почками, гипофизом и жировой тканью крыс [14], а также маткой хомяка [23]. Проведены эксперименты, свидетельствующие о накоплении КСГ клетками MCF-7 (клеточная линия рака молочной железы человека) [19] и FAO (клеточная линия гепатомы крысы) [16]. Эти данные указывают на существование механизма переноса КСГ крови через плазматические мембраны внутрь клеток ряда тканей.

В этом плане особый интерес представляет недавно обнаруженное явление избирательного взаимодействия комплексов кортизола и вариантов КСГ, содержащихся в крови беременных женщин,—КСГ нормальной крови доноров (нКСГ) и связанной с беременностью разновидности КСГ (рКСГ)—с мембраной синцитиотрофобласта человека [6]. Образование комплекса со стероидным гормоном—необходимое условие для специфического взаимодействия нКСГ и рКСГ с участками связывания на мембране синцитиотрофобласта [3]. Трофобласт не только является тканью-мишенью глюкокортикоидов [17], но, как известно, представляет собой важнейшую часть плацентарного барьера, через который осуществляется избирательный обмен различными веществами (в том числе стероидными гормонами и белками крови) между кровеносными системами матери и плода. Существование в мембране синцитиотрофобласта двух типов участков специфического связывания [6] с различным сродством к нКСГ и рКСГ, циркулирующим в крови женщин во время беременности, свидетельствует о возможности существования разнообразных физиологических механизмов взаимодействия комплексов гормон—гликопротеин с данной тканью.

Удобной моделью для изучения трансмембранного переноса являются мембранные микровезикулы, которые можно легко получить из щеточной каемки трофобласта плаценты человека [25]. В отличие от культур клеток или образцов ткани микровезикулы не содержат внутриклеточных энзимов или связывающих белков, которые могут влиять на результаты целевых экспериментов.

Вместе с тем микровезикулы сохраняют все основные свойства мембраны синцитиотрофобласта и, будучи суспендированными в буфере, представляют уникальную систему, состоящую из двух физических объемов, разделенных селективной мембраной.

Целью настоящего исследования было изучение взаимодействия нКСГ и рКСГ с микровезикулярной фракцией мембраны щеточной каемки синцитиотрофобласта в условиях, допускающих протекание транспортных процессов.

Материалы и методы

КСГ выделяли из сыворотки ретроплацентарной крови человека, как описано ранее [2]. Радиододирование КСГ проводили с использованием препарата «Йодоген» («Riege», США) [11]. Удельная радиоактивность полученных препаратов ^{125}I -КСГ составляла 50—70 мкКи/мкг, а их радиохимическая чистота была не ниже 98%. Иммунохимическая чистота, определенная с помощью моноспецифической антисыворотки к КСГ человека, составляла 100%. В эксперименте использовали [1,2,6,7- ^3H] кортизол («Amersham», Англия) с удельной активностью 94 Ки/ммМ. Для разделения ^{125}I -КСГ и немеченого КСГ на молекулярные варианты использовали аффинную хроматографию на иммобилизованном конканавалине А [2].

Везикулярную фракцию мембраны щеточной каемки синцитиотрофобласта получали, как описано ранее [25]. Для этого использовали нормальные послеродовые плаценты человека.

При изучении возможности трансмембранного транспорта нКСГ и рКСГ препарат микровезикул суспендировали в изотоническом буфере, содержащем 0,005 М трис-НСl pH 7,6, 0,15 М NaCl, 0,01 М CaCl₂, 0,004 М KCl и 0,001 MgCl₂. Суспензию делили на две равные части, одну разводили в 10 раз изотоническим буфером указанного выше состава (1), другую—дистиллированной водой (2). Через 1 ч осуществляли центрифугирование при 20 000 г в течение 1 ч. Полученные осадки интактных микровезикул (1) и разорванных в результате осмотического «шока» микровезикул (мембранных фрагментов) (2) ресуспендировали в изотоническом буфере.

По 0,5 мл суспензии микровезикул (250—350 мкг белка по методу Лоури) вносили в аналитические пробирки, содержащие 0,5 мл изотонического буфера с определенным количеством сахарозы в диапазоне концентраций 0,12—1,5 М либо буфер без сахарозы. Параллельная серия проб содержала вместо микровезикул мембранные фрагменты. Микровезикулы и мембранные фрагменты инкубировали с буфером определенной осмолярности в течение 10 мин при 37° С и затем использовали для изучения трансмембранного переноса кортизола и комплексов нКСГ (рКСГ)—кортизол (прогестерон или тестостерон).

В первом случае в аналитические пробы прибавляли 50 мкл ^3H -кортизола до концентрации в пробе $1 \cdot 10^{-8}$ М. Реакцию останавливали центрифугированием при 10 000 г в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, осадки суспендировали в 0,3 мл 5% холата Na и экстрагировали стероид бензолом. Измеряли радиоактивность бензолных экстрактов с помощью счетчика «Mark-III» («Тгасог Еуропа», Голландия).

Во втором случае в аналитические пробы, содержащие микровезикулы (мембранные фрагменты) после преинкубации

в буфере определенной осмолярности, прибавляли 50 мкл смеси кортизола (прогестерона или тестостерона) и нКСГ (рКСГ) (^{125}I -гликопротеин + немеченый гликопротеин). Окончательная концентрация стероидов в пробах составляла $1 \cdot 10^{-7}$ М, вариантов КСГ — $1 \cdot 10^{-8}$ М или $1 \cdot 10^{-10}$ М. Пробы инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Остановку реакции осуществляли, как указано выше. Надосадочную жидкость удаляли и измеряли радиоактивность осадков с помощью счетчика радиоактивности «RIA-Gamma» («LKB-Wallac», Финляндия).

После проведения анализа связывания осуществляли контроль за степенью нативности ^{125}I -нКСГ (рКСГ) в надосадочной жидкости. Радиохимическая и иммунохимическая чистота гликопротеинов составляла не менее 90%.

Результаты и их обсуждение

Как упоминалось выше, в плазматической мембране синцитиотрофобласта человека нами обнаружены два типа участков специфического связывания КСГ. Одни из них, высокоаффинные, проявляют сродство к нКСГ и рКСГ, характеризующееся значениями K_d , равными соответственно $2,5 \cdot 10^{-11}$ М и $3,3 \cdot 10^{-12}$ М. Другие, относительно низкоаффинные, проявляют более высокое сродство к нКСГ ($K_d = 1,6 \cdot 10^{-10}$ М), чем к рКСГ ($K_d = 4,5 \cdot 10^{-9}$ М). Высокоаффинные участки связывания характеризуются более низкими значениями максимальной связывающей емкости ($V_{\max} = 3$ фмоль/мг), чем относительно низкоаффинные ($V_{\max} = 150$ фмоль/мг) [6].

Выяснение механизмов взаимодействия нКСГ и рКСГ в комплексе с кортизолом с мембраной синцитиотрофобласта предполагает изучение возможности их проникновения во внутренний объем микровезикул. В первую очередь мы сравнили взаимодействие с микровезикулами свободного гормона (на примере кортизола) и гормона, связанного гликопротеином (нКСГ или рКСГ) при 23 и 37°C (рис. 1). Было найдено, что даже в условиях, когда большая доля кортизола ($\sim 90\%$) находилась в связанном с гликопротеином состоянии, зависимость поглощения связанного ^3H -кортизола микровезикулами от времени практически не отличалась от связывания свободного гормона. Таким образом, гликопротеин не ограничивает поступление гормона в синцитио-

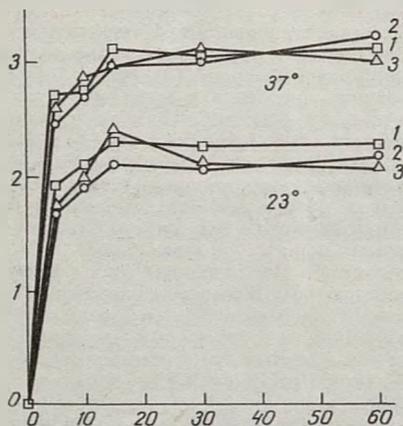


Рис. 1. Временная зависимость связывания ^3H -кортизола микровезикулами при различных температурах в отсутствие гликопротеинов (1) и в присутствии нКСГ (2) и рКСГ (3). Концентрация стероида $1 \cdot 10^{-8}$ М, гликопротеинов $1 \cdot 10^{-7}$ М. Данные типичного эксперимента.

По оси ординат — связанный кортизол (в тыс. имп/мин); по оси абсцисс — время (в мин).

трофобласт, и имеется принципиальная возможность для трансмембранного переноса комплекса гормон — гликопротеин. Это согласуется с полученными нами ранее данными [15] о совпадении кинетических параметров взаимодействия с микровезикулами свободного ^3H -кортизола и комплексов ^3H -кортизола с нКСГ либо рКСГ.

Известно, что внутривезикулярный объем является функцией осмолярности среды. В частности, была показана [9] линейная зависимость между количеством ^3H - α -аминомасляной кислоты либо ^3H -кортикоостерона, поступающих во внутренний объем микровезикул мембраны синцитиотрофобласта, и концентрацией сахарозы в инкубационном буфере. Наша задача состояла в установлении зависимости между величиной связывания микровезикулами ^{125}I -нКСГ и ^{125}I -рКСГ в виде комплексов с кортизолом и концентрацией сахарозы в инкубационном буфере. Поскольку изменение осмолярности буфера может оказывать влияние не только на величину внутривезикулярного объема, но также на текучесть липидов, латеральную подвижность мембранных рецепторов и другие параметры мембраны синцитиотрофобласта [7], в параллельной серии экспериментов определяли влияние концентрации сахарозы в инкубационной среде на связывание ^{125}I -нКСГ и ^{125}I -рКСГ мембранными фрагментами, полученными с помощью гипоосмотического «шока» микровезикул, т. е. фрагментами, лишенными внутреннего объема. В экспериментах нКСГ и рКСГ использовали в концентрациях $1 \cdot 10^{-8}$ М (рис. 2, а) и $1 \cdot 10^{-10}$ М (рис. 2, б), что позволило изучить их взаимодействие с относительно низкоаффинными и высокоаффинными участками связывания соответственно.

Как видно на рис. 2, связывание микровезикулами ^{125}I -нКСГ (в комплексе с кортизолом), подобно связыванию свободного гормона (рис. 3), зависит от внутривезикулярного объема. Это означает, что нКСГ может проникать внутрь микровезикул. Данный вывод подтверждается тем фактом, что количество ^{125}I -нКСГ, связанное мембранными фрагментами, практически не отличается от величины связывания, рассчитанной с помощью экстраполяции кривой 1 к нулевому значению внутривезикулярного объема.

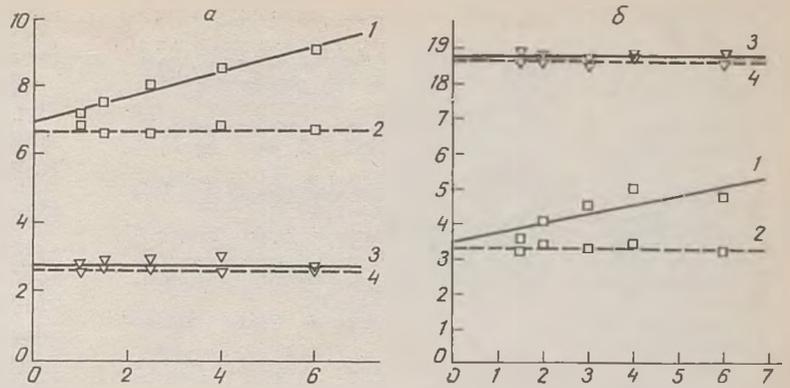
В отличие от нКСГ, связывание рКСГ микровезикулами не зависит от внутреннего объема последних (см. рис. 2). При всех используемых концентрациях сахарозы как интактные микровезикулы, так и мембранные фрагменты, полученные с помощью гипоосмотического шока микровезикул, связывали одно и то же количество рКСГ. Это означает, что рКСГ взаимодействует только с поверхностью микровезикул и не может проникать через мембрану синцитиотрофобласта.

Так как рКСГ не ограничивает поглощение кортизола микровезикулами (см. рис. 1), мы полагаем, что рКСГ функционирует как транспортный «челнок», снабжающий трофобласт стероидом. Это согласуется с полученными нами ранее данными [5] об отсутствии рКСГ в крови плода и экстрактах плаценты.

В случае нКСГ, по-видимому, происходит совместный трансмембранный перенос гликопротеина и связанного с ним гормона, причем этот процесс не зависит от природы стероида. Так,

Рис. 2. Зависимость связывания ^{125}I -нКСГ (1, 2) и ^{125}I -рКСГ (3, 4) в комплексе с кортизолом микровезикулами (сплошная линия) и фрагментами (пунктирная линия) плазматической мембраны синцитиотрофобласта от осмолярности среды при 37°C .
Концентрация кортизола $1 \cdot 10^{-7}\text{ M}$, гликопротеинов $1 \cdot 10^{-8}\text{ M}$ (а) и $1 \cdot 10^{-10}\text{ M}$ (б).

По оси ординат — связанный гликопротеин (в тыс. имп/мин); по оси абсцисс — концентрация сахарозы (в M^{-1}).



параллельное изучение взаимодействия ^{125}I -нКСГ в присутствии насыщающих концентраций кортизола, прогестерона и тестостерона с одним и тем же препаратом микровезикул показало (см. таблицу), что величина связывания нКСГ в комплексе с любым гормоном была практически одинаковой и в равной степени зависела от внутреннего объема микровезикул. Это согласуется с полученными нами ранее данными [3] о совпадении величины мембранного связывания комплексов нКСГ с указанными стероидами при 4°C .

Последствия взаимодействия нКСГ и рКСГ в комплексе со стероидами с каждым из двух известных типов участков связывания, локализованных в плазматической мембране синцитиотрофобласта, не зависят от типа последних (высокоаффинные или относительно низкоаффинные) и определяются исключительно природой гликопротеина (нКСГ или рКСГ). Поскольку эти гликопротеины отличаются только строением углеводных компонентов [5], полученные данные свидетельствуют о том, что олигосахаридные цепи вовлечены не только в первичный акт узнавания данных гликопротеинов связывающими участками, но и в последующие биохимические процессы.

Биологический смысл поступления нКСГ из крови в клетки остается неясным. В работе

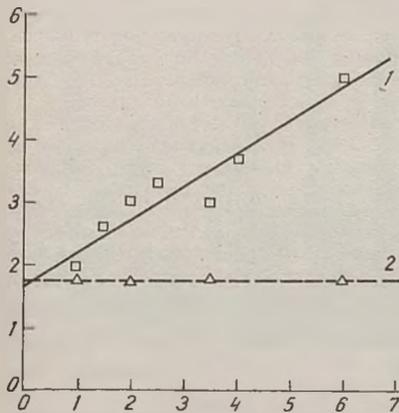


Рис. 3. Зависимость связывания ^3H -кортизола микровезикулами (1) и фрагментами (2) плазматической мембраны синцитиотрофобласта от осмолярности среды при 37°C . Средние значения по результатам трех независимых определений. Концентрация стероида $1 \cdot 10^{-8}\text{ M}$.

По оси ординат — связанный кортизол (в тыс. имп/мин); по оси абсцисс — концентрация сахарозы (в M^{-1}).

[22] высказываются следующие предположения: КСГ доставляет стероиды к внутриклеточным рецепторам стероидных гормонов в защищенной от внутриклеточных ферментов форме; КСГ выполняет самостоятельную биологическую функцию, о чем свидетельствуют активация аденилатциклазы и накопление внутриклеточного цАМФ в клетках рака молочной железы человека МСФ-7 после взаимодействия с ними гликопротеина.

Таким образом, можно предположить существование по крайней мере двух различных механизмов проникновения стероидных гормонов в клетки-мишени с участием специфических стероидсвязывающих гликопротеинов: трансмембранный перенос гормон-гликопротеинового комплекса как единого целого; специфическое взаимодействие гормон-гликопротеинового комплекса с мембраной с последующей диссоциацией комплекса на мембране и переносом гормона внутрь клетки-мишени.

Выводы

1. Взаимодействие нКСГ в комплексе со стероидом (кортизол, прогестерон, тестостерон) с мембраной синцитиотрофобласта сопровождается трансмембранным переносом гликопротеина.
2. Взаимодействие рКСГ в комплексе со стероидом с мембраной синцитиотрофобласта происходит без последующего переноса гликопротеина через мембрану.

Взаимодействие ^{125}I -нКСГ в комплексе с кортизолом (А), прогестероном (Б) и тестостероном (В) с микровезикулами синцитиотрофобласта при различных значениях осмолярности инкубационной среды при 37°C

Концентрация сахарозы в $0,17\text{ M}$ буфере, M	Связывание комплекса ^{125}I -нКСГ — стероид, имп/мин		
	А	Б	В
0,75	5 500	5 800	5 400
0,50	6 600	6 000	5 900
0,25	8 000	7 800	8 200
0,13	8 900	8 600	8 900
0,06	9 500	9 600	9 600
0	10 600	11 000	10 900

Примечание. Приведены результаты типичного эксперимента. Концентрация гликопротеина — $1 \cdot 10^{-8}\text{ M}$, стероидов — $1 \cdot 10^{-7}\text{ M}$.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аввакумов Г. В., Крупецко С. А., Дубовская Л. В., Стрельченко О. А. // Биохимия.—1988.—Т. 53, № 4.—С. 586—590.
2. Вашкевич И. И., Матвеевцева И. В., Аввакумов Г. В., Стрельченко О. А. // Там же.—1984.—Т. 49, № 12.—С. 1972—1985.
3. Киселева Е. П., Вашкевич И. И., Стрельченко О. А. // Там же.—1992.—Т. 58, № 11.—С. 1788—1795.
4. Amaral L., Werthamer S. // Nature.—1976.—Vol. 262, № 5585.—P. 589—591.
5. Avvakumov G. V., Strel'chyonok O. A. // Biochim. biophys. Acta.—1987.—Vol. 925, № 1.—P. 11—16.
6. Avvakumov G. V., Strel'chyonok O. A. // Ibid.—1988.—Vol. 938, № 1.—P. 11—16.
7. Bowen B. J., Morgan E. H. // J. cell. Physiol.—1988.—Vol. 134, № 1.—P. 1—12.
8. De Kloet E. R., McEwen B. S. // Biochim. biophys. Acta.—1976.—Vol. 421, № 1.—P. 124—129.
9. Fant M. E., Harbison R. D., Harrison R. W. // J. biol. Chem.—1979.—Vol. 254, № 14.—P. 6218—6221.
10. Feldman D., Fander J. M., Edelman I. S. // Endocrinology.—1973.—Vol. 92, № 4.—P. 1429—1432.
11. Fracer P. J., Speck J. C. // Biochem. biophys. Res. Commun.—1978.—Vol. 80, № 4.—P. 849—857.
12. Giannopoulos G. // J. Steroid Biochem.—1976.—Vol. 7, № 8.—P. 553—558.
13. Hryb D. J., Khan M. S., Romas N. A., Rosner W. // Proc. nat. Acad. Sci. USA.—1986.—Vol. 83, № 10.—P. 3253—3256.
14. Hsu B. R.-S., Siiteri P. K., Kuhn R. W. // Colloq. INSERM.—1986.—Vol. 149.—P. 577—591.
15. Kisseleva E. P., Vashkevich I. I., Avvakumov G. V., Strel'chyonok O. A. // Biochem. biophys. Res. Commun.—1990.—Vol. 173, № 3.—P. 961—966.
16. Kuhn R. W. // Ann. N. Y. Acad. Sci.—1988.—Vol. 538.—P. 146—158.
17. Lageston G. M., Spelsberg T. G., Coulam C. B. // Amer. J. Obstet. Gynec.—1983.—Vol. 145, № 4.—P. 515—523.

© Ю. В. ПОГОРЕЛОВ, С. В. ДИНДЯЕВ, 1994

УДК 618.11-008.6-07

Ю. В. Погорелов, С. В. Диндяев

НЕЙРОМЕДИАТОРНЫЕ БИОАМИНЫ В ГИСТОГЕНЕЗЕ ЖЕЛТЫХ ТЕЛ

Кафедра гистологии и эмбриологии (зав.—проф. Ю. В. Погорелов) Ивановского медицинского института

Одним из компонентов эндокринной системы яичников являются желтые тела цикличности, вырабатывающие ряд стероидных гормонов — прогестерон, эстрогены и андрогены [2, 17]. В регуляции функции желтых тел принимают участие гонадотропные гормоны гипофиза [2, 4], простагландины [4, 9, 10], перитонеальные макрофаги [14, 15], нейромедиаторные биоамины [4, 5, 9, 10]. Специфическая роль последних проявляется не только в передаче симпатических влияний, но, в частности, и в «пусковом» действии на метаболические процессы, чувствительности тканей к гуморальным стимулам, в синхронизации процессов овариально-менструального цикла [4, 5]. Нейромедиаторы являются и посредниками между гормонами и рецепторно-циклическими системами [1]. Изучение этих веществ позволяет установить единство механизмов нейрогуморальной регуляции гомеостаза [1, 2].

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей нейромедиаторного биоаминового обеспечения желтых тел цикличности на различных стадиях его развития.

Материалы и методы

Исследования выполнены на 27 кошках. Криостатные срезы яичников обрабатывали по методу А. Бьерклунда в модификации В. Н. Швалева и Н. И. Жучковой [8], рН инкубаци-

18. Mayer M., Kaiser N., Milholland R. J., Rosen F. // J. biol. Chem.—1975.—Vol. 250, № 4.—P. 1207—1211.
19. Nakhla A. M., Khan M. S., Rosner W. // Biochem. biophys. Res. Commun.—1988.—Vol. 153, № 3.—P. 1012—1018.
20. Perrot-Appianat M., David-Ferreira J. F., David-Ferreira K. L. // Endocrinology.—1981.—Vol. 109, № 4.—P. 1625—1633.
21. Perrot-Appianat M., Racadot O., Milgrom E. // Ibid.—1984.—Vol. 115, № 2.—P. 559—569.
22. Rosner W. // Endocr. Rev.—1990.—Vol. 11, № 1.—P. 80—91.
23. Selker K. W., Leavitt W. W. // Biol. Reprod.—1988.—Vol. 39, № 4.—P. 592—597.
24. Siiteri P. K., Murai J. M., Hammond J. L. et al. // Recent Progr. Hormone Res.—1982.—Vol. 38.—P. 457—510.
25. Smith C. H., Nelson D. M., King B. E. et al. // Amer. J. Obstet. Gynec.—1977.—Vol. 128, № 2.—P. 190—196.
26. Werthamer S., Samueles A. J., Amaral L. // J. biol. Chem.—1973.—Vol. 248, № 18.—P. 6398—6407.

Поступила 04.01.94

Ye. P. Kiselyova, I. I. Vashkevich, O. A. Strelchenok — TRANSCORTIN INTERACTION WITH HUMAN SYNCYTIOTROPHOBLAST

Summary. Interactions of transcortin (corticosteroid-binding globulin, CBG) variants, nCBG and rCBG, present in the blood of pregnant women, and microvesicular fraction of the brush border membrane of human placental syncytiotrophoblast at 23+2° C were studied. Interaction of nCBG in complex with a steroid with each of the two types for specific binding was found associated with transmembranous transfer of glycoprotein. Interaction of rCBG with binding sites of both types did not involve subsequent glycoprotein transfer through the membrane. Possibility of penetration of only one CBG variant through syncytiotrophoblast membrane suggests the presence of different mechanisms of these glycoproteins' participation in the hormonal effects of steroids associated with them.

онного раствора составляла при этом 7,0 для одновременного выявления 5-окситриптамина и катехоламинов [12]. Цитоспектрофлуориметрию осуществляли на микроскопе ЛЮМАМ-ИЗ с приставкой ФМЭЛ-1А (фильтры ЖС, ФС 1-2, СЗС 24-4, БС 8-3). Тестирование флюоресценции изучаемых структур осуществлялось зондами 0,1 (для элементов нервных волокон) и 0,5 (для макрофагов) при интерференционных фильтрах 8 и 6 (длина волны пропускания соответственно 525 и 480 нм), что позволило микроспектрофлуориметрически идентифицировать соответственно альдегидиндуцированное свечение серотонина и катехоламинов, а также по интенсивности флюоресценции судить об их содержании в исследуемых структурах [3]. Замер интенсивности свечения производился в условных единицах шкалы регистрирующего прибора Ш-300. Относительное содержание серотонина и катехоламинов определяли в варикозных расширениях и межварикозных участках симпатических терминалей и периваскулярных сплетений, в макрофагах оболочки и паренхимы желтого тела. Стадия развития желтого тела определялась с помощью совокупности данных морфологического анализа, радиоиммунологического определения в сыворотке крови прогестерона и эстрогенов, влагалищных мазков, выявления липидов суданом черным.

Результаты и их обсуждение

Предыдущие наши исследования [6, 7] позволили выделить в яичниках внутриорганный комплекс биоаминового обеспечения (ВКБО). К его основным структурным элементам, участвующим в синтезе, захвате, функциональной реали-