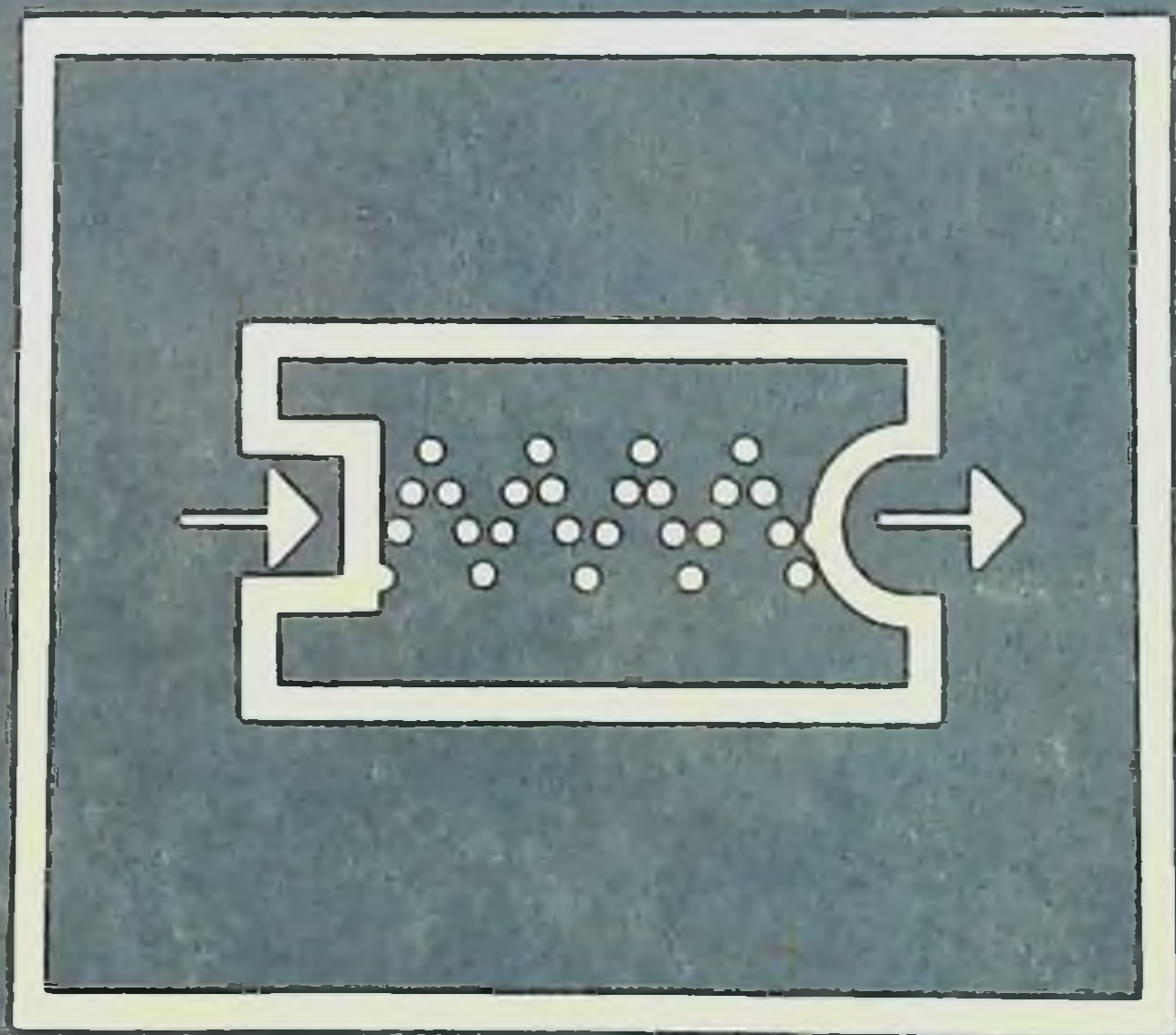


Ф504

ФИЗИОЛОГИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕЦЕПЦИИ

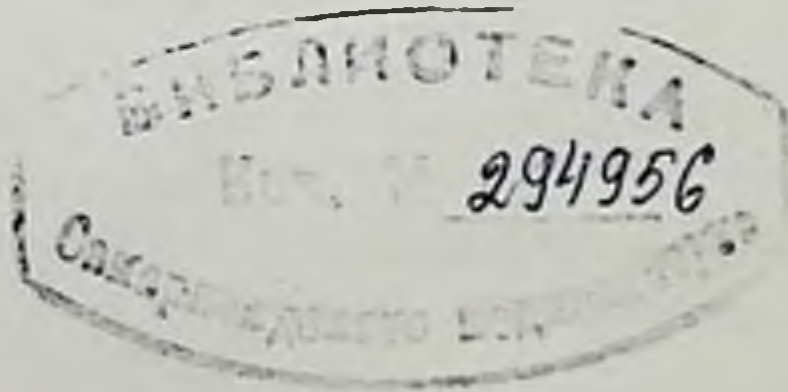


АКАДЕМИЯ НАУК СССР
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. И. П. ПАВЛОВА

Ф 504



ФИЗИОЛОГИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕЦЕПЦИИ



ЛЕНИНГРАД
ИЗДАТЕЛЬСТВО «НАУКА»
ЛЕНИНГРАДСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
1986

Физиология гормональной рецепции / В. Г. Шаляпина, Н. А. Арутюнян, В. Н. Бабичев, И. А. Гарина, Д. А. Жуков, Б. Н. Лейбуш, М. М. Орлов, В. В. Ракицкая, А. Г. Резников, В. Б. Розен, О. Н. Савченко, Н. Е. Тихонова; Под ред. В. Г. Шаляпиной. — Л.: Наука, 1986. — 231 с.

В коллективной монографии обобщены результаты исследований ведущих отечественных лабораторий в области изучения гормональной рецепции. Рассматриваются вопросы структурной и функциональной организации рецепторов, их локализации в различных органах и принципы регуляции в норме и при эндокринных нарушениях. Библиогр. 605 назв. Табл. 5. Ил. 27.

Ответственный редактор

В. Г. ШАЛЯПИНА

Рецензенты:

Н. А. ЕМЕЛЬЯНОВ, Г. С. СТЕПАНОВ

ВВЕДЕНИЕ

Эндокринология переживает сейчас один из важных этапов своего развития. Рецепторная теория, которая возникла с введением в практику изотопов, существенно изменила наши представления о взаимодействии гормонов с клетками и сконцентрировала внимание на эффекторном звене эндокринной системы. Исследование структуры и функции гормональных рецепторов занимает сейчас важное место в изучении эндокринной регуляции, а выяснение этих вопросов все больше упирается в применение методов их идентификации.

Рецепторы гормонов — это белковые молекулы, имеющие специфические центры связывания и осуществляющие передачу сигналов гормонами на эффекторные клетки. Они представляют собой довольно сложные образования, расположенные либо на клеточной поверхности, если дело касается белков и пептидов, либо внутри клеток, если это относится к тиреоидным гормонам или стероидам. По своему назначению рецепторы гормонов являются как бы сенсорами эндокринной системы, способными отличать гормоны от других химических субстанций, циркулирующих в крови. Кроме функции узнавания, которая и одна могла бы определить их биологическую значимость, рецепторные структуры связывают гормон на время, необходимое для его взаимодействия с теми или иными посредниками, через которые реализуется гормональный ответ. По всей видимости, функция рецепторов определяется при этом их основными признаками, такими, как биологическая специфичность, высокое сродство к гормону и быстрая насыщаемость. Эти свойства выявляются современными методами биохимического и радио-рецепторного анализа и могут быть охарактеризованы как в исходном состоянии, так и при нарушении эндокринных функций.

Наши знания о гормональных рецепторах сформировались не сразу. Существенное значение в их развитии имели работы Ленгли, который еще в 1905 г. назвал «рецептивной субстанцией» сократительные элементы мышц, реагирующие на атропин и пилокарпин. Затем основы рецепторной теории развивал Кларк, считавший, что сила биологического эффекта гуморальных факторов зависит от числа занятых ими рецепторов. Известные работы Алквиста, охарактеризовавшего рецепторы катехоламинов, а затем и исследования Дженсона по взаимодействию эстрадиола с клетками-мишенями привели к созданию стройной теории, которой суждено было завоевать умы сотен исследователей и стать одной из центральных в физиологии 60—80-х годов.

Настоящая монография подводит итог определенного этапа исследований гормональной рецепции, проводимых у нас в стране. Обобщенные в виде отдельных глав, они отражают в основном физиологические аспекты гормональной рецепции с позиций роли этих рецепторов в общей системе регуляции эндокринных функций.

В главе первой (В. Б. Розен) сформулированы общие представления о рецепторах гормонов, их структуре и свойствах, а также дано современное понимание вопроса, разделяемое всеми соавторами монографии.

Глава вторая (В. Г. Шаляпина и др.) посвящена роли глюкокортикоидных рецепторов в действии гормонов адреналовых желез. Она может служить обзором, дополненным собственными данными и отражающим понимание функциональной роли рецепторов в действии кортикостероидов по механизму обратной связи.

Важной и насыщенной собственными экспериментальными данными является глава третья, автор которой (В. Н. Бабичев) на протяжении многих лет изучает функциональную организацию репродуктивной системы и гормональные механизмы ее регуляции. Большое внимание уделено в ней рецепции половых гормонов в структурах мозга, участвующих в регуляции репродуктивных функций.

Глава четвертая (О. Н. Савченко и др.) концентрирует внимание на периферических рецепторах половых гормонов, главным образом — рецепторах эстрадиола и прогестерона в матке. Наряду с функциональной ролью этих рецепторов в главе обсуждается вопрос о их взаимодействии при регуляции основных функций этого органа. Проводя определенную аналогию в функционировании гормональных рецепторов у животных и человека, авторы делают попытку сформулировать свое представление о рецепторах как исходных звеньях функциональных нарушений.

Особое место в книге занимает пятая глава, посвященная физиологии рецепторов мужских половых гормонов (А. Г. Резников). Оригинальные данные автора по этому вопросу обсуждены в главе с учетом современных представлений и восполняют существующий пробел в этой области.

Вопрос о рецепторах белковых гормонов представлен в шестой главе (Б. Н. Лейбуш), автор которой успешно изучает механизм действия инсулина на клетку. В этой главе упор сделан на эволюционные аспекты проблемы, что имеет важное значение в формировании рецепторной теории. Эта глава дополняется следующей, седьмой главой (Н. Е. Тихонова), отражающей современные данные о роли инсулиновых рецепторов в патогенезе сахарного диабета.

Все авторы монографии надеются, что их скромный труд будет полезен эндокринологам и найдет соответствующий отклик в их среде.

Глава I

РЕЦЕПТОРЫ ГОРМОНОВ, ИХ СТРУКТУРА, СВОЙСТВА И ЗАКОНОМЕРНОСТИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ В КЛЕТКАХ

Ключевым этапом физиологического действия гормона на клетку является его спонтанное и обратимое комплексообразование с биоспецифическим белком-рецептором.

Если в клетке нет рецепторов, гормон не способен воздействовать на нее (Jensen, Jacobson, 1962; Jensen et al., 1972). Это свидетельствует о том, что рецептор является необходимым периферическим звеном эндокринной функции, обеспечивающим саму возможность, а также интенсивность приема, проведения и реализации гормональных сигналов (Розен, 1981; Розен, Смирнов, 1981). Относительно клетки рецепторы — внутриклеточные регуляторы метаболизма, а гормоны — внеклеточные аллостерические их эффекторы. Относительно целого организма гормоны — системные внеклеточные сигналы, а рецепторы — распознающие посредники гормонального эффекта.

МОДЕЛЬ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ МОЛЕКУЛЫ РЕЦЕПТОРА

На основании многочисленных данных по изучению структуры и свойств белков рецепторов различных гормонов создана (Vaulieu, 1975) общая феноменологическая модель структурно-функциональной организации рецепторной молекулы (рис. 1). Считается, что рецепторная молекула состоит из трех главных пространственно разобщенных локусов, осуществляющих соответственно три основные динамически сопрягаемые функции: 1) избирательный прием гормонального сигнала, который выполняется дискретным локусом, специфически и обратимо связывающим гормон; 2) инициацию регуляторных эффектов гормона вследствие избирательного взаимодействия гормон-рецепторного комплекса с раз-

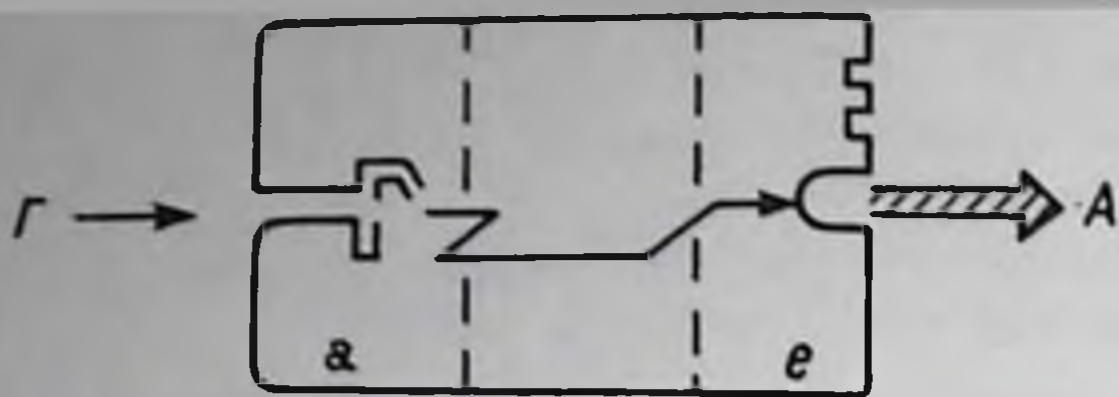


Рис. 1. Модель функционально-структурной организации рецепторной молекулы. а — гормонсвязывающий участок, е — эффекторный участок, зигзагообразная линия — участок сопряжения а и е, Г — гормон, А — акцептор.

личными акцепторными структурами клетки (осуществляется отдельным исполнительным участком или участками рецепторной молекулы); 3) проведение (трансдукция) принятого внешнего гормонального сигнала с переводом его в новый, внутриклеточный сигнал благодаря первичной конформационной перестройке рецепторной молекулы (выполняется участками внутримолекулярного сопряжения двух первых). Иначе говоря, рецептор — это единая функциональная структура с асимметрично расположенными детерминантами, одна из которых связывает гормон, другая (другие) избирательно связывается с акцепторами клетки и инициирует биологические эффекты.

ТИПЫ ЦИТОРЕЦЕПЦИИ

По клеточной локализации рецепторов, характеру акцепторных мест и особенностям инициируемых эффектов циторецепция гормонов может быть подразделена на два основных типа: 1) внутриклеточный, по которому рецептируются в разных вариантах стероидные и тиреоидные гормоны; 2) поверхностный (мембранный), по которому рецептируются белковые и пептидные гормоны, катехоламины, а также практически все гистогормоны и нейромедиаторы (Розен, 1984). В первом случае гормон относительно свободно проникает через плазматическую мембрану внутрь клетки, взаимодействует там с рецепторами (цитозольными, ядерными и другими) и не требует на первых этапах своего действия образования внутриклеточных медиаторов. В этом случае наиболее важные акцепторные сайты для гормон-рецепторных комплексов локализованы в ядре, наиболее типичные их эффекты сопряжены с синтезом ферментов и других белков и медленно развиваются во времени. Не исключено, что часть цитозольных рецепторов может быть связана с хроматином, лизосомальной, плазматической и ядерной мембранами, а также с элементами цитоскелета. Лишь рецептор прогестерона ооцита (это единственный пока известный случай) представляет собой мембранный белок, работающий по закономерностям мембранных рецепторов (Vaullien, 1975).

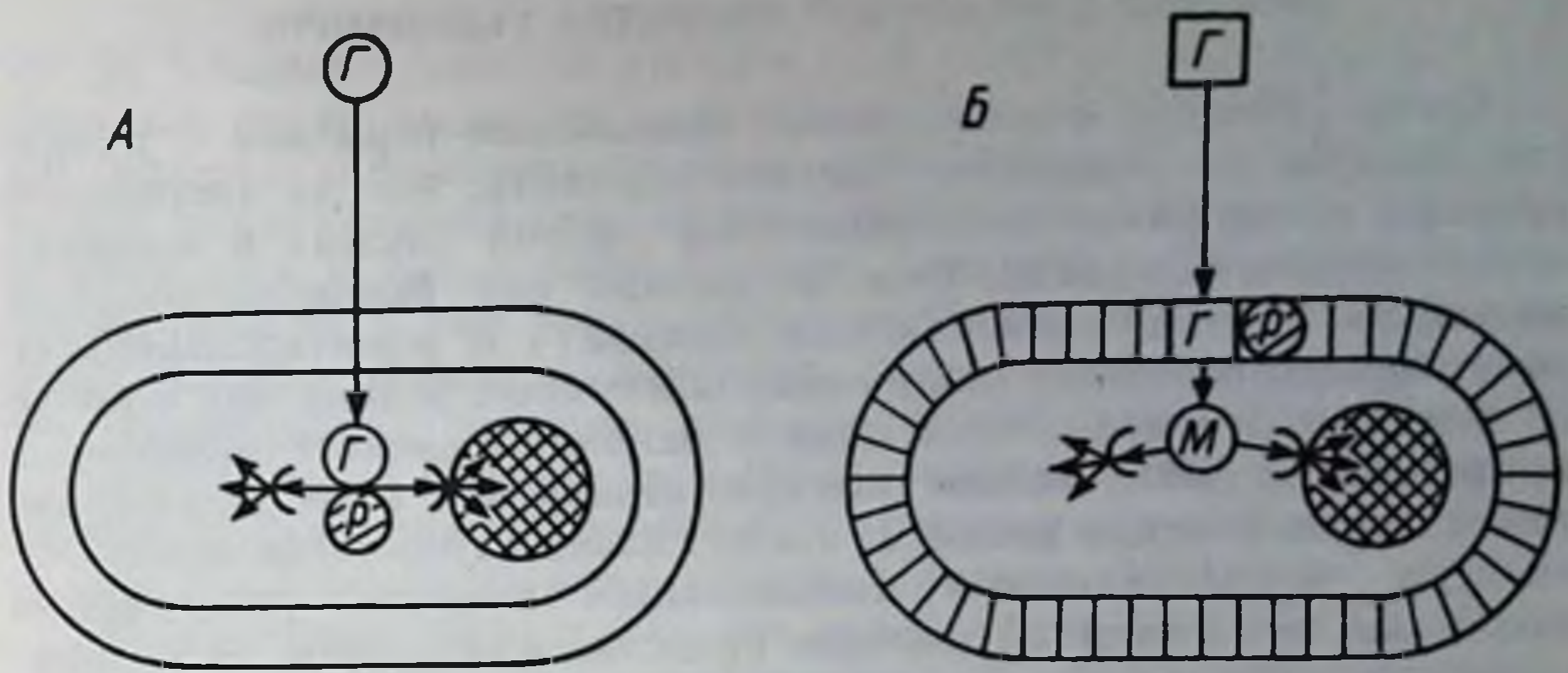


Рис. 2. Основные типы рецепции.

А — внутриклеточный рецептор, Б — мембранный рецептор, Г — гормон, Р — рецептор, М — внутриклеточный медиатор Г.

Во втором случае гормоны связываются с рецепторами, расположенными, как правило, в плазматической мембране. Они плохо проникают в клетки, хотя гормональные эффекты реализуются внутри клеток, благодаря образованию уже на первых этапах рецепции внутриклеточных медиаторов в результате взаимодействия гормон-рецепторных комплексов с мембранными акцепторными структурами. Такими мембранными акцепторами являются аденилатциклаза, неэлектрогенные кальциевые каналы и специфические протеазы, а внутриклеточными медиаторами — соответственно цАМФ, Ca^{2+} , специфические гликопептиды (Розен, 1984). Раньше к числу акцепторных мест причисляли также гуанилатциклазу, а к первичным медиаторам — цГМФ (Ткачук, 1981). В настоящее время показано, что гуанилатциклаза и цГМФ, если и участвуют в опосредовании эффекта гормон-рецепторного комплекса, то лишь вторично. Наиболее типичной, хотя и не единственной особенностью влияния гормонов, действующих с поверхности, являются относительно быстрые эффекты, обусловленные активацией уже синтезированных функциональных и структурных белков (рис. 2).

Описанные два типа рецепции, имея ряд существенных отличительных черт, характеризуются принципиально общими закономерностями, касающимися главным образом механизмов приема гормонального сигнала. Далее пути этих типов рецепции расходятся, хотя и протекают по одной и той же общей схеме.

Специфическое нековалентное связывание гормонов — пусковой процесс их рецепции. Следует отметить, что до настоящего времени специфически связываемый лиганд служит в эксперименте главным индикатором рецептора как биоспецифической молекулы клетки, позволяющим выявлять и идентифицировать рецепторную молекулу как в смеси клеточных белков, так и после ее очистки. В связи с этим знание основных свойств рецепторов представляет собой весьма важную задачу как в теоретическом, так и в практическом плане. К числу главных гормонсвязывающих свойств, осуществляемых специальным локусом рецепторной молекулы, относятся: а) высокое сродство к гормонам, б) избирательность сродства, в) ограниченная емкость (Розен, 1973; Vaullien, 1975). Указанные свойства существенно отличают рецепторы от самых различных белков, неспецифически связывающих гормоны.

Высокий уровень сродства к гормонам определяется значением константы их ассоциации, равной при 0°C $10^7 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$, что отражает уровень свободной энергии комплексообразования $(-8) - (-13)$ ккал/моль. В свою очередь константа ассоциации зависит от величины констант скорости ассоциации ($K_{+1} = 10^3 - 10^6 \text{ M}^{-1} \times \text{с}^{-1}$) и диссоциации ($K_{-1} = 10^{-6} - 10^{-4} \text{ M} \times \text{с}^{-1}$). В отличие от рецепторных неспецифически связывающие белки образуют комплексы с коэффициентом ассоциации равным $10^3 - 10^5 \text{ M}^{-1}$. Интересно, что этот параметр для рецепторов стероидных гормонов, видимо, находится в обратной зависимости от концентрации лигандов в крови. Так, наибольшую константу ассоциации имеют рецепторы эстрогенов (10^{10} M^{-1}), а наименьшую (10^8 M^{-1}) — рецепторы глюкокортикоидов.

Высокий уровень избирательности сродства к гормонам заключается в том, что рецепторы способны связывать лишь определенные группы природных и синтетических гормонов, а также антигормонов. В частности, рецепторы эстрогенов образуют комплексы только с эстрогенными и антиэстрогенными соединениями, рецепторы прогестинов — лишь с гестагенами и их конкурентными антагонистами, а инсулиновые рецепторы взаимодействуют с инсулином, плохо связывая даже его А- и В-цепи. Показано, что в большинстве случаев биологическая активность гормона положительно коррелирует с величиной константы ассоциации и отрицательно с величиной константы диссоциации. Согласно полученным данным, гормон, ковалентно связанный с рецептором, способен включать эффекторные локусы рецепторной молекулы (Simons et al., 1983), а нековалентно ассоциируемые с рецептором антигормоны, как правило, не способны активировать рецепторные участки, что делает связывание лиганда неэффективным. По-видимому, для достижения эффективного взаимодействия гормона с рецептором необходима достаточно высокая пороговая величина свободной энергии комплексообразования, соответствующая константе ассоциации, равной $10^6 -$

10^7 M^{-1} . Однако высокий уровень этой энергии может быть необходимым, но не достаточным условием для включения гормонального эффекта гормон-рецепторным комплексом. Известны синтетические конкурентные антагонисты некоторых гормонов, которые ассоциируют с рецептором больше, чем основные гормоны-агонисты. Вместе с тем такие антагонисты не способны вызывать гормональный эффект, а, наоборот, лишь препятствуют проявлению последнего. Вероятно, для воспроизведения гормонального эффекта высокий уровень свободной энергии гормон-рецепторного взаимодействия должен сочетаться с некими структурными свойствами в молекуле гормона (Розен, Смирнов, 1981).

По-видимому, избирательность сродства рецептора к лигандам исходно определяет дискриминированный прием гормонального сигнала, а следовательно, обуславливает избирательность действия гормона на клетку. Необходимо иметь в виду, что многие рецепторы обладают относительной избирательностью сродства к определенным гормонам. Например, прогестинные рецепторы слабо связывают андрогены, а андрогенные рецепторы — соответственно прогестины. Вероятно, такая относительность лигандной специфичности открывает возможности для межгормональных взаимодействий по линии антагонизма гормонов, а также их синергизма в определенных физиологических ситуациях.

В отличие от рецепторного неспецифического связывание охватывает самые различные группы гормональных соединений.

Ограниченная связывающая емкость рецепторов зависит от низкой концентрации их связывающих мест в клетке и, следовательно, сводится к их быстрой насыщаемости гормонами. Как правило, на молекулу рецептора приходится одно связывающее место. По-видимому, лишь в двух известных случаях, касающихся инсулиновых рецепторов и прогестероновых рецепторов яйцеводов птиц, на одну молекулу рецептора приходится два связывающих места (Schradner, O'Malley, 1978; Czech, Massague, 1982). Последнее может хорошо объяснить выявленный отрицательный кооперативный эффект в процессе взаимодействия инсулина с рецептором, число связывающих мест равно 10^{-15} — 10^{-11} моль/мг белка, или 500—30 000 связей на клетку. Ограниченная емкость рецепторов обеспечивает действие гормона в рамках физиологических или умеренных фармакологических концентраций. Вместе с тем известно, что в физиологических условиях только небольшая доля рецепторных молекул в клетке оккупирована гормоном (Kahn, Roth, 1976). Поскольку процесс обратимого, нековалентного комплексования гормона с рецептором осуществляется в соответствии с законом действия масс, можно полагать, что избыточная концентрация рецепторов обеспечивает прежде всего высокую скорость гормон-рецепторного взаимодействия.

НЕКОТОРЫЕ ВАЖНЕЙШИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ И ДАННЫЕ ОБ ИХ СТРУКТУРЕ

Физико-химические свойства рецепторов и ряд их структурных характеристик были вначале получены на неочищенных или частично очищенных препаратах. Впоследствии эти данные были в значительной мере подтверждены на высокоочищенных препаратах рецепторов. Оказалось, что рецепторы — это кислые крупномолекулярные олигомерные белки, для внутриклеточных рецепторов простые, для мембранных — это гликопротеины. Все рецепторные белки термолабильны и склонны к образованию тяжелых агрегатов, что в сочетании с их малым содержанием в клетке — обстоятельства, усложняющие их исследование.

Показано, что цитоплазматические и ядерные рецепторы гидрофильны, а мембранные в основном гидрофобны. Локализуясь трансмембранно, гидрофобная часть поверхностных рецепторов оказывается погруженной в бислойную липидную мембрану, в то время как гормонсвязывающие и исполнительные участки находятся в водной фазе.

Считается, что взаимодействие рецепторной молекулы мембран с гормоном и гормон-рецепторных комплексов с акцептором реализуется в водной фазе внеклеточной жидкости и цитозоля (Yuenger et al., 1980). По-видимому, то же следует сказать и о митохондриальных рецепторах тиреоидных гормонов. Мембранные рецепторы могут быть солюбилизированы с сохранением их физиологической активности с помощью детергентов типа луброла РХ или тритона.

Рецепторы стероидных гормонов. Структура стероидных рецепторов в настоящее время наиболее полно изучена. Это гидрофильные, весьма термолабильные белки, которые высаливаются сульфатом аммония при 30—35 % насыщения. В среде с низкой ионной силой (концентрация $KCl < 0.3 M$) рецепторы разных стероидных гормонов имеют коэффициент седиментации 6.5—9 S, молекулярную массу 150—320 КД, радиус Стокса 5—8.5 нм и асимметричную форму (Розен, Смирнов, 1981; Розен, 1984). В среде с высокой ионной силой олигомерный рецепторный белок (холорецептор) в комплексе с гормоном или без него полностью, но обратимо диссоциирует на собственно 3.5—4 S-рецепторную субъединицу (верорецептор) и специальный формирующий фактор (Miyoyama, Fakai, 1983). Верорецептор сохраняет все функциональные свойства рецепторной молекулы, и в частности специфическое связывание гормона и способность приобретать высокое сродство к акцепторным местам хроматина. Вместе с тем 6.8 S-формирующий фактор представляет собой сложный олигомерный белок, состоящий в случае эстрогенных рецепторов из прочно, но обратимо связанных между собой компонента А и шести компонентов В. Гормонсвязывающей активностью он не обладает вообще, а к хроматину может иметь весьма низкое сродство. Следует отметить, что субъединицы формирующего

фактора имеют разное сродство к верорцептору, характеризуемое коэффициентом ассоциации $4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ для субъединицы А и $3.5 \times 10^9 \text{ M}$ для А + 6В, и в различных условиях способны образовывать разных размеров комплексы. Формирующий фактор, по-видимому, играет регуляторную роль для функционирования верорцептора в отношении способности его взаимодействия с ядерным хроматином. Согласно одним данным (Miyoyama, Fakai, 1983) он ингибирует это взаимодействие, согласно другим (Романов и др., 1981) — стимулирует.

Вероятнее всего, структурная организация рецепторных белков для разных стероидных гормонов более или менее сходна, однако имеются и исключения из общего правила. В частности, андрогенные рецепторы сирийского хомячка в некоторых тканях, видимо, не диссоциируют с образованием верорцептора и формирующего фактора, сохраняя коэффициент седиментации 8 S при увеличении концентрации KCl до 0.6 M (Schmidt, Visek, 1978). До сих пор остается недостаточно выясненным вопрос о функционально-структурной организации димерных прогестиновых рецепторов яйцеводов кур.

С помощью мягкого ферментативного гидролиза верорцептора в присутствии ингибиторов протеаз лейпептина или антипаина удалось вычленить из структуры рецепторной субъединицы ту минимальную ее часть, которая еще полностью сохраняет его специфические гормонсвязывающие свойства, но уже теряет способность взаимодействовать с ядерным хроматином. Этот минимальный участок, очевидно, идентичен гормонсвязывающему локусу рецептора и обозначается как «мерорцептор». Его коэффициент седиментации равен 2.5 S, а радиус Стокса 2.5 нм (Sherman et al., 1974). Возможно, мерорцептор по структуре гетерогенен (рис. 3).

Большинство авторов считают, что ядерные рецепторы стероидных гормонов, связанные главным образом с хроматином, имеют цитозольное происхождение, накапливаясь в ядре вторично, в результате перехода в него гормон-рецепторных комплексов из цитозоля (Jensen et al., 1972). Вследствие этого ядерные и цитозольные рецепторы имеют принципиально общие физико-химические и иммунологические свойства.

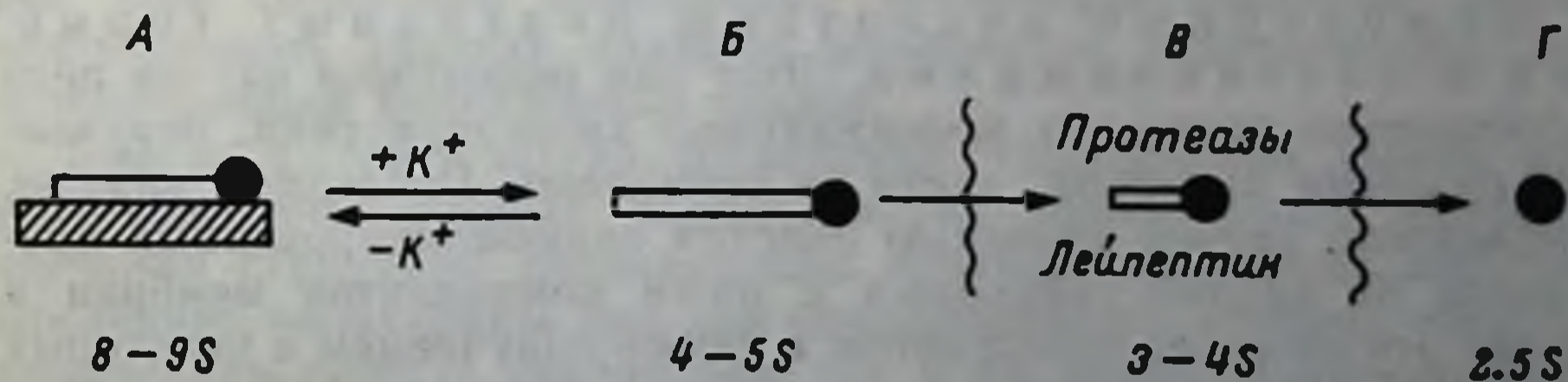


Рис. 3. Схема мягкого протеолиза рецептора стероидных гормонов.

А — 8—9 S холорцептор, Б — протеолизруемый 4—5 S верорцептор, В — 3—4 S лигат верорцептора, Г — 2.5 S мерорцептор.

Рецепторы тиреоидных гормонов. Но существующим весьма неполным данным (Tata, 1980), эти рецепторы представлены несколькими независимыми пулами различных ядерных, цитоплазматических и митохондриальных рецепторных белков и, возможно, белков плазматических мембран. Общим свойством различных фракций рецепторов тиреоидных гормонов является их преимущественное сродство (в 10—20 раз) к трийодтиронину по сравнению с тироксином. Очевидно, тироксин в клетках-мишенях прежде чем образовать комплексы с разными популяциями рецепторов превращается в основном в трийодтиронин.

Ядерные рецепторы. Известно, что они составляют до 90 % всего количества рецепторов и в большинстве органов-мишеней имеют 10^4 связывающих мест на клетку (Tata, 1980). По своей химической природе это термолабильные кислые негистоновые белки с коэффициентом седиментации 3 S, молекулярной массой 50.5 кД, радиусом Стокса 3.5 нм; константа ассоциации рецепторов трийодтиронина составляет в опытах *in vivo* 10^{11} M^{-1} , а в опытах *in vitro* 10^8 — 10^9 M^{-1} (Трапкова, Верещагина, 1984).

Митохондриальные рецепторы. Эти рецепторы расположены во внутренней мембране митохондрий и представляют собой относительно термостабильные липопротеины, выявляемые лишь в экспериментах *in vitro*. По своим связывающим свойствам рецепторы этого небольшого пула близки к главным ядерным рецепторам трийодтиронина (Трапкова, Верещагина, 1984).

Цитозольные рецепторы. Они относятся к термолабильным кислым белкам, с молекулярной массой 100 кД и константой ассоциации по крайней мере на 2—3 порядка ниже, чем для ядерных рецепторов (Surks, Oppenheimer, 1976). Вследствие этого в эутиреоидном состоянии с цитоплазматической фракцией рецепторов связано только около 1 % трийодтиронинов. Функциональная роль этого пула рецепторов пока неясна, однако показано, что он не осуществляет взаимодействия тиреоидных гормонов с рецепторными белками ядра.

Имеются данные о существовании тиреоидных рецепторов в плазматических мембранах (Трапкова, Верещагина, 1984), однако они не раскрывают физико-химических свойств этих рецепторных белков.

Мембранные рецепторы пептидных гормонов и катехоламинов. Этот тип рецепторов изучен пока недостаточно полно, их молекулярные характеристики, полученные разными авторами, часто не совпадают. Последнее, видимо, обусловлено разной степенью очистки солюбилизированных препаратов от прочно связанных с ними компонентов мембран и трудно отмываемых детергентов, а также получением в некоторых случаях агрегированных форм рецепторных молекул. Так, например, молекулярная масса рецепторов лютропина варьирует в пределах 23—96 кД, а рецепторов глюкагона — от 23 до 53 кД (Воейков, 1984).

Возможно, с этим же связаны большие различия в молекулярных размерах рецепторов. Величина их коэффициента седиментации колеблется от 4 до 8 S, молекулярная масса — от 23 до 450 кД, радиусы Стокса — от 3 до 7 нм. Третичная и четвертичная структуры мембранных рецепторов почти не охарактеризованы, однако можно полагать, что и они являются олигомерными белками. Так, рецептор инсулина состоит из 2 полипептидных α -цепей с молекулярной массой 125 кД и двух β -цепей с молекулярной массой 90 кД, связанных друг с другом дисульфидными мостиками (Czech, Massague, 1982).

Мембранные рецепторы обычно асимметрично встроены в плазматическую мембрану, причем узнающий фрагмент их молекул жестко ориентирован к наружной ее поверхности, в сторону межклеточного пространства. Взаимодействующий с акцептором докус ориентирован в противоположную сторону, к цитоплазме клеток (Yuenger et al., 1980). Относительно жесткая ориентация такого рода рецепторов обуславливает, вероятно, векторность трансмембранного потока гормональной информации, приходящей извне внутрь клеток. Несмотря на относительную жесткость фиксации таких рецепторов в мембране, они все же способны совершать продольные и поперечные движения, как бы облегчая тем самым «поиск» рецептора и взаимодействие гормон-рецепторных комплексов с акцепторными местами.

Однако в некоторых случаях, например в случае инсулинового рецептора, его молекулы не фиксированы в толще мембраны столь жестко и совершают свободные движения не только латеральные и «поплавковые», но и вращательные, обращаясь различными функциональными фрагментами то в сторону внеклеточного, то в направлении внутриклеточного пространства (Yuenger et al., 1980). В этих случаях отсутствие жесткой асимметрии и трансмембранной локализации компенсируется их высокой подвижностью.

ОЧИСТКА РЕЦЕПТОРНЫХ БЕЛКОВ

Низкая концентрация рецепторных белков в клетке, составляющая менее 0.01 % белков цитозоля, их лабильность и способность к агрегации создают серьезные сложности при очистке рецепторов. При выделении мембранных рецепторов возникает также необходимость удалить примеси детергентов, используемых для солюбилизации рецепторных белков.

Вместе с тем очистка рецепторов чрезвычайно важна для уточнения структурных характеристик рецепторных молекул, изучения структуры связывающих центров, получения антител. Последние необходимы как для сравнительного анализа иммунохимических свойств рецепторов, так и их количественного определения. В целях очистки рецепторов используются методы классической белковой химии в сочетании с методами полуаффинной и аффинной хроматографии. Из классических методов белковой

химии наиболее широко используются фракционирование рецепторов сульфатом аммония, хроматография на ДЭАЭ — целлюлозе и гидроксиллапнатите, электрофокусирование, препаративный электрофорез в полиакриламидном геле и другие. К полуаффинным методам относятся методы хроматографии на ДНК-целлюлозе, гепарин-агарозе и фосфоцеллюлозе, к которым имеет повышенное сродство активированная форма цитозольных рецепторов стероидных гормонов. Однако решающим этапом очистки рецепторов является метод аффинной хроматографии, согласно которой стероидные гормоны ковалентно присоединяются через полиалифатическую цепь или белок («руку») к углеводному матриксу сефарозы или агарозы. Присоединение «руки» снижает неспецифическую адсорбцию рецепторного белка к матриксу. При синтезе аффинного сорбента чрезвычайно важно, чтобы не блокировать участки гормональных молекул, ответственные за их взаимодействие с рецепторами. Элюция рецепторов с аффинной колонки обычно достигается повышением температуры в присутствии соответствующего меченого гормона.

Сочетанием традиционных методов белковой химии, полуаффинной и аффинной хроматографии удается получить препараты $>90\%$ очищенных рецепторов (Розен, Смирнов, 1981; Taylor, Smith, 1982). Следует отметить, что обычно выделяются верорецепторные субъединицы, связывающие гормон и имеющие высокое сродство к акцепторам.

Данные по разным физико-химическим свойствам верорецепторов, полученные на неочищенных и очищенных препаратах, обычно хорошо совпадают.

СВЕДЕНИЯ ПО ИММУНОЛОГИИ РЕЦЕПТОРОВ

Получение высокоочищенных препаратов рецепторов создало реальную возможность выработки к ним антител, в том числе и моноклональных, позволивших провести сравнительное изучение иммунологических свойств различных рецепторных белков и получить их дополнительные структурные характеристики. Наиболее полно изучены иммунологические свойства рецепторов стероидных гормонов. В частности, при помощи высокоочищенного препарата ядерных рецепторов эстрадиола (Jensen et al., 1979) были получены у коз, кроликов и крыс высокоспецифические антитела к этому рецепторному белку. Антитела оказались неprecипитирующими белками и не связывали эстрадиол. Иммунологический анализ позволил выявить, что антитела коз и кроликов дают перекрестные иммунные реакции с ядерными и цитоплазматическими рецепторами эстрогенов из репродуктивных тканей разных видов млекопитающих и яйцеводов кур, что свидетельствует о наличии общих антигенных детерминант у эстрогенных рецепторов разного видового и тканевого происхождения. Выработанные антитела к эстрогенным рецепторам имеют общие детерминанты

с рецепторами прогестинов и андрогенов разного происхождения. Эстрогенные рецепторы ядер и цитозоля имеют общие антигенные свойства, что лишний раз свидетельствует о цитоплазматическом происхождении ядерных рецепторов. Вместе с тем ядерные формы рецепторов эстрогенов связываются выработанными к ним антителами в большей степени, чем цитозольные, что в свою очередь говорит об определенной структурной модификации эстроген-рецепторных комплексов в процессе их транслокации из цитоплазмы в клеточное ядро. В той же работе было показано, что получение трех различных моноклональных линий гибридомных клеток, образованных слиянием клеток селезенки иммунизированных крыс с разными линиями миеломных клеток мышей, может обусловить гетерогенность получаемых иммуноглобулинов. Так, одна линия продуцировала в основном иммуноглобулины М, взаимодействующие преимущественно с ядерными рецепторами, а другие линии были продуцентами иммуноглобулинов, легко образующими комплексы как с ядерными, так и с цитоплазматическими рецепторами.

Аналогичные данные были получены в других работах по изучению иммунологических свойств рецепторов стероидных гормонов, однако их результаты в значительной мере зависят от применяемых антигенов и степени их очистки, вида иммунизируемых животных, условий получения и выявления гибридомных линий и т. д. (Loceat et al., 1981; King et al., 1983; Monchamont, Parkin, 1983). Исследования по иммунологии и иммунохимии гормональных рецепторов только начинаются, поэтому анализ иммунологических характеристик различных рецепторных белков, так же как и создание методов их иммунологического количественного анализа, следует ожидать в ближайшем будущем.

УНИ- И МУЛЬТИРЕЦЕПТОРНАЯ КОНЦЕПЦИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ГОРМОНА С КЛЕТКОЙ-МИШЕНЬЮ

Рассматривая свойства гормональных рецепторов, мы исходили из общепринятой у н и р е ц е п т о р н о й к о н ц е п ц и и действия гормонов. Согласно этой концепции, гормоны связываются в клетках рецепторами не независимо от их локализации, а расхождение путей множественного действия гормонов реализуется на пострецепторных этапах. Вместе с тем в настоящее время накоплено большое количество данных, позволяющих выдвинуть м у л ь т и р е ц е п т о р н у ю к о н ц е п ц и ю инициации гормональных эффектов, согласно которой циторепторный аппарат может быть представлен гетерогенной популяцией рецепторов и расхождение путей инициации действия гормонов может осуществляться на рецепторном уровне (Розен, Смирнов, 1981). Можно допустить, что функциональная гетерогенность рецепторов способна быть фактором повышения избирательности действия гормонов на клетки и ткани.

МОДЕЛИ РЕЦЕПЦИИ ГОРМОНОВ РАЗНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ

В настоящем разделе будут рассмотрены основные механизмы функционирования рецепторов в клетке. Как уже отмечалось, деятельность рецепторного аппарата различна для разных гормонов, в особенности после их специфического связывания узнающим локусом рецепторных белков.

В настоящее время на основании разнообразных и многочисленных биохимических и цитохимических данных построены достаточно убедительные модели функционирования внутриклеточных и мембранных рецепторов, отвечающие совокупности большинства накопленных экспериментальных фактов.

Модели рецепции стероидных гормонов

На рис. 4 представлена общая феноменологическая модель рецепции стероидных гормонов (Jensen et al., 1972; Розен, Смирнов, 1981; Розен, 1984). Согласно этой модели, рецепция стероидов клеткой складывается из ряда этапов.

1. Стероидный гормон, не связанный специфическими транспортными белками крови (транскортин, сексстероидсвязывающий глобулин, прогестеронсвязывающий белок и другие), способен относительно свободно проникать через плазматические мембраны внутрь клетки и быстро связываться в цитозоле с соответствующими рецепторами. Не исключено, что небольшая доля цитозольных рецепторов может быть лабильно связана с плазматическими мембранами и другими субклеточными фракциями (Кислинг и др., 1980). Не исключено также, что в нецитозольных цитоплазматических фракциях содержатся и особые пулы рецепторов, функционирующие отдельно от основной части цитозольных рецепторных белков (Liao et al., 1973; Kanazir et al., 1978). В результате связывания гормона в молекулах рецепторов происходят конформационные изменения.*

2. Образовавшийся в цитозоле гормон-рецепторный комплекс под действием ряда факторов, таких как повышение температуры, увеличение ионной силы, разведение, гельфильтрация и т. д., способен подвергаться активации, проявляющейся в резком повышении сродства комплекса к ядерному хроматину, и прежде всего к ДНК. По-видимому, эта стадия протекает в клетке спонтанно в результате обратимой диссоциации микромолекулярного комплекса, а возможно, и ряда макромолекулярных ингибиторов с рецептором. Активироваться может и сам рецептор. Однако гормон, связываясь с ним, сдвигает равновесие в комплексе рецептор-ингибитор(ы) в сторону процесса их диссоциации и тем самым

* Некоторые авторы (Martin, Sheridan, 1982) полагают, что в живой клетке большая часть рецепторов стероидных гормонов исходно локализованы в ядре.

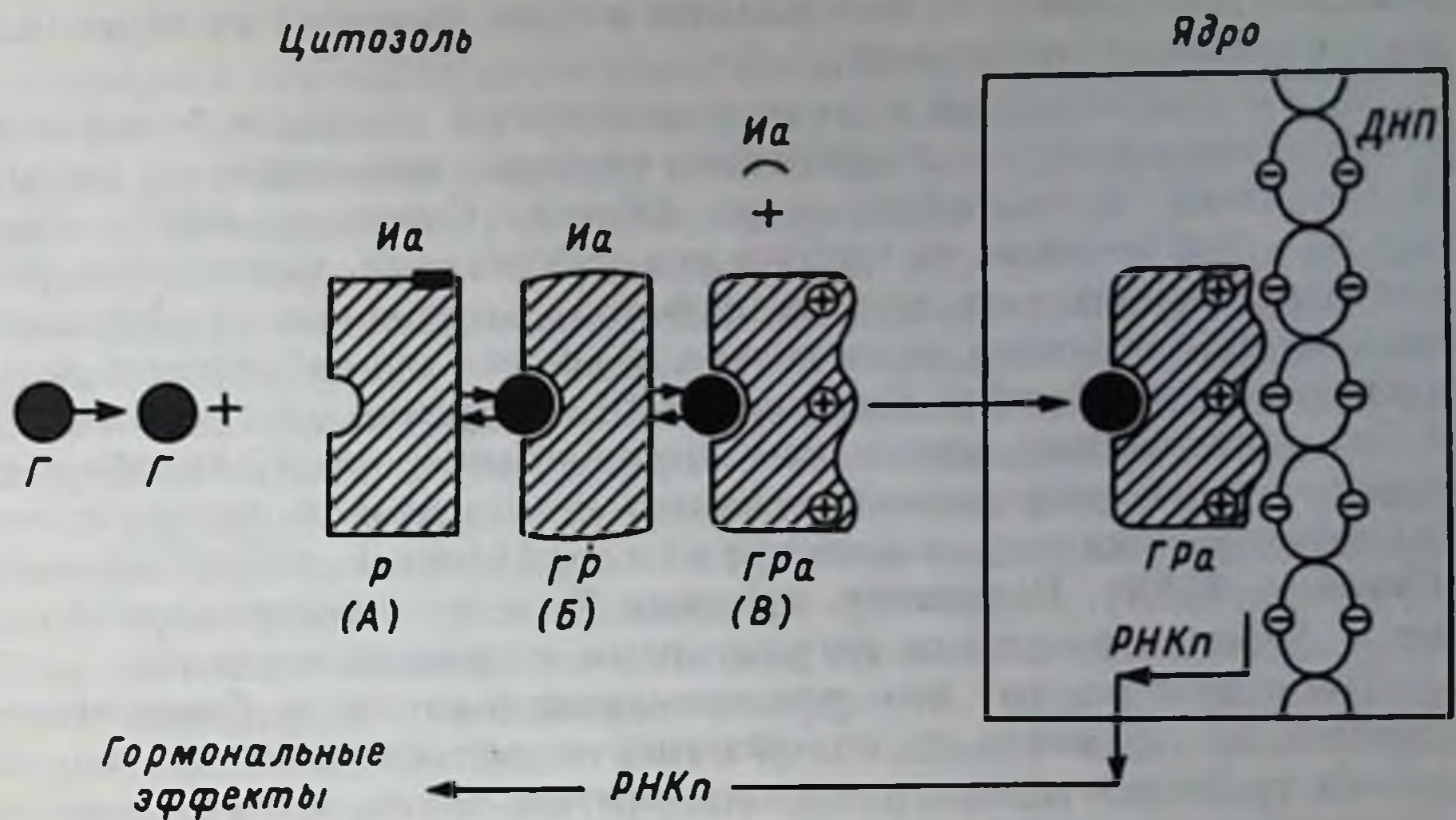
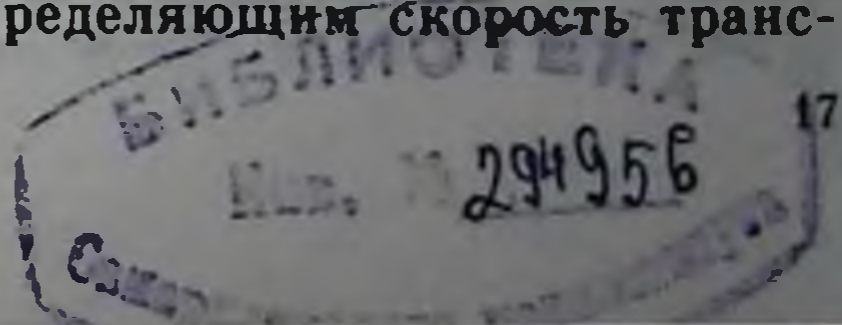


Рис. 4. Модель основных стадий рецепции стероидных гормонов.

Г — гормон, Р — верорецептор; GR — исходный Г—Р-комплекс; Иа — низкомолекулярный ингибитор активации Г—Р-комплекса; А, Б, В — конформационные состояния Г—Р-комплекса; ДНП — хроматин; РНКп — РНК, индуцируемые Г—Р-комплексом.

усиливает и стабилизирует процесс (Розен, Смирнов, 1981). Освобождение гормон-рецепторного комплекса от ингибитора(ов) приводит к дополнительной конформационной перестройке молекулы рецептора с локальным выходом на поверхность положительных зарядов остатков лизина и аргинина. Вследствие этого ранее кислый белок становится функционально амфотерным, что позволяет ему электростатически связываться не только с поликатионами, но и с полианионами, в частности с ДНК (Розен, Смирнов, 1981). Показано при этом, что заряд рецепторов молекулы существенно не изменяется (Розен, Смирнов, 1981), однако локальные изменения заряда, с одной стороны, несколько снижают сродство активированных рецепторов к поликатионам типа ДЭАЭ-целлюлозы, что позволяет в эксперименте отдельно определять обе формы рецепторных белков (Селезнев и др., 1981). С другой стороны, как уже отмечалось, активированные рецепторы приобретают высокое сродство к полианионам, в частности к ДНК. Кроме того, полифакторная активация гормон-рецепторного комплекса может быть одновременно обусловлена не столько электростатическими факторами, сколько появлением в этих комплексах иных, не электростатических, а структурных изменений, создающих возможность усиленно взаимодействовать с хроматином, и прежде всего с ДНК (Романов и др., 1981). Об этом свидетельствует относительно избирательная способность активированного комплекса взаимодействовать с полинуклеотидами разного состава при близости величин их заряда (Романов и др., 1981). По всей видимости, главным механизмом, определяющим скорость транс-



локации комплексов из цитоплазмы в ядро, является их обратимая полифакторная активация.

3. Активированный гормон-рецепторный комплекс вследствие повышенного сродства к хроматину свободно перемещается (транслоцируется) в клеточное ядро (Розен, Смирнов, 1981). Этот процесс, как правило, не требует притока энергии, дополнительного синтеза нуклеиновых кислот и белка, не зависит от функционирования элементов цитоскелета и уровня проницаемости ядерных мембран (Gorsky, Gannon, 1976). Показано, что витамин В₆ и его производные, такие как пиридоксаль-фосфат, ингибируют транслокацию уже активированных комплексов и вместе с тем способствуют выходу рецепторов из ядер (Litwack, 1979; Cidlowski, Thanassi, 1981). Возможно, витамин В₆ и его производные являются физиологическими регуляторами рецепции гормонов.

Несмотря на то что процесс транслокации в большинстве случаев не зависит от интенсивности метаболизма клетки, он может требовать дополнительного синтеза белка, что имеет место, например, при транслокации андроген-рецепторных комплексов в вентральной простате крысы (Bloudeau et al., 1982).

4. В хроматине активированный гормон-рецепторный комплекс связывается и взаимодействует с акцепторными местами хроматина, индуцируя развитие множественных эффектов гормона и регулируя процессы транскрипции.

Специальный интерес представляет вопрос о природе акцепторных мест хроматина и взаимодействии с ними гормон-рецепторных комплексов. Установлено, что стероид-рецепторные комплексы способны связываться практически со всеми компонентами хроматина, с ДНК, РНК, некоторыми кислыми и основными белками (Розен, Смирнов, 1981; Розен, 1984). Согласно данным последних лет, доминирующую роль во взаимодействии с гормон-рецепторными комплексами играют поликатионные свойства и особенности структуры ДНК. При этом ДНК может обеспечивать транслокацию гормон-рецепторных комплексов в клеточное ядро и их аккумуляцию в ядерном хроматине, участвовать в изменениях структуры хроматина, а также в специфических изменениях уровня транскрипции под действием гормон-рецепторных комплексов (Романов и др., 1981). Последнее имеет особое значение, так как процесс транскрипции является основным в инициации избирательного физиологического действия стероид-рецепторных комплексов. В этом плане заслуживают внимания два важных факта, характеризующие механизмы взаимодействия гормон-рецепторных комплексов с хроматином.

Первый из этих фактов получен в ряде экспериментальных моделей, в которых был использован глюкокортикоидзависимый вирус ММТV опухолей молочной железы мыши, ген овальбумина яйцеводов кур, и с помощью очищенных рецепторов глюкокортикоидов или прогестерона методами генной инженерии получены данные, свидетельствующие о существовании в геноме ограниченного числа акцепторных локусов, избирательно взаимодей-

ствующих с гормон-рецепторным комплексом. Такие клонированные локусы длиной 1.7—4.5 кбаз нуклеотидных последовательностей расположены, видимо, вблизи тех регуляторных участков генома, которые кодируют гормонзависимые мРНК (Payvar et al., 1981; Govindan et al., 1982; Comton et al., 1983). Установлено, что специфические нуклеотидные последовательности связывают гормон-рецепторные комплексы с относительно небольшим отличием в скорости ассоциации по сравнению с комплексами с большим количеством неспецифически связывающих участков ДНК.

Обнаружено также, что во многих случаях имеет место линейная зависимость избирательного эффекта гормонов от концентрации гормон-рецепторных комплексов (Mulvihill, Palmiter, 1977). Если бы только специфические места хроматина определяли динамику инициации гормонального эффекта, для их насыщения потребовалось бы не более 5—10 % от общего числа рецепторов в клетке. В этом случае эффект достигал бы максимума при переходе в ядро лишь этого небольшого количества гормон-рецепторных комплексов. Вместе с тем специфическая реакция клетки на гормон продолжает нарастать до тех пор, пока не исчерпывается весь запас цитозольных рецепторов. Кроме того, гормон-рецепторные комплексы воспроизводят в клеточном ядре сильную, неспецифическую дестабилизацию хроматина, увеличивая его общую транскрипционную активность в 1.6—3 раза (Johnson, Baxter, 1978). Эта структурная перестройка хроматина положительно коррелирует со специфическими гормональными эффектами и, в частности, с синтезом соответствующих мРНК и белков. По-видимому, в кинетике гормональной индукции синтеза мРНК и белков лимитирующим механизмом является именно неспецифическое связывание хроматином гормон-рецепторных комплексов (Розен, Смирнов, 1981). Такого рода механизм действия последних может объяснить происхождение общетрофических, но не строго избирательных, специфических гормональных эффектов в клетках-мишенях.

Для согласования приведенных выше данных высказана гипотеза о существовании двух сопряженных механизмов взаимодействия стероид-рецепторных комплексов с хроматином: а) легко насыщаемое избирательное связывание комплексов с ограниченным числом специфических акцепторных участков ДНК, регулирующих транскрипцию определенных генов, т. е. механизм селективности эффекта; б) ненасыщаемое связывание комплексов с большим числом разных участков ДНК и, возможно, других компонентов хроматина, приводящих к его деконденсации и общему повышению матричной активности, т. е. механизм интенсивности эффекта. Первый механизм обуславливает качественную, а второй — соответственно количественную сторону гормонального эффекта (Розен, Смирнов, 1981; Розен, 1984).

5. Таким образом, гормон-рецепторные комплексы, взаимодействуя с хроматином, специфически изменяют уровень синтеза определенных мРНК, а также рРНК, и выход их из ядра после

процессинга в цитоплазму, где вторично изменяется уровень синтеза соответствующих функциональных и структурных белков в полисомах.

6. Рассматривая вопросы взаимодействия комплексов гормон-рецептор с ядерным хроматином, необходимо остановиться на изменениях свойств ядерных рецепторов в процессе указанного взаимодействия. Прежде всего необходимо отметить, что в процессе транслокации комплексов в клеточное ядро происходит накопление в них рецепторов, растворимых в 0.3—1 М КСl. Однако наряду с этим в ядре появляются, а затем накапливаются другие рецепторы, нерастворимые в КСl. В зависимости от типа клеток, природы гормона, его дозы и времени после начала экспозиции резистентные в КСl формы ядерных рецепторов могут составлять от 5 до 90 % общего количества комплексов в ядре (Розен, Смирнов, 1981). Проведенные некоторыми авторами исследования позволили предположить, что именно эта форма рецепторов является активной для специфической регуляции процессов транскрипции (Keefeg, 1981). Однако данные других исследователей дают основание думать, что накопление КСl-нерастворимых рецепторов имеет отношение к процессу терминации рецепторного цикла и предшествует рециклизации рецепторов, т. е. возвращению активных рецепторов из ядра в цитозоль (Розен, Смирнов, 1981).

Считается, что специальные факторы терминации, инактивирующие рецептор или/и ферменты стероидного метаболизма, инактивирующие гормон, завершают рабочий цикл рецепторов.

Установлено, что большинство эффектов стероидных гормонов на клетки обусловлено изменением уровня транскрипции в ядре. Однако в некоторых типах клеток ряд важных эффектов стероидов может реализоваться экстрануклеарно, на посттранскрипционных уровнях. Таким образом осуществляется стимуляция выброса простагландинов в матке под действием эстрогенов, разрастание децидуальной ткани под влиянием прогестинов, торможение активации кининов в результате действия глюкокортикоидов и т. д. Возможно, это обусловлено взаимодействием стероид-рецепторных комплексов не только с ядром, но и с полисомами, мембранами ретикулума, компонентами цитоскелета (Kapazir et al., 1978; Смирнов, 1978; Розен, Смирнов, 1981).

Модель рецепции тиреоидных гормонов

Как уже указывалось, рецепторы тиреоидных гормонов в клетках представлены несколькими отдельно функционирующими популяциями, главную из которых в количественном и качественном плане составляют ядерные рецепторные белки. По-видимому, в связи с этим ядерная рецепция тиреоидных гормонов наиболее полно изучена в настоящее время. По существующим данным, она складывается из следующих основных этапов (Tata, 1980).

1. Трийодтиронин и тироксин, не связанный с плазменным тироксинсвязывающими глобулином и преальбумином, относительно свободно проникают внутрь клетки. Последний превращается в трийодтиронин, который взаимодействует преимущественно с клеточным ядром, где специфически связывается с рецепторами тиреоидных гормонов.

2. Эти рецепторы расположены на молекуле ДНК, а связывание гормон-рецепторного комплекса зависит как от его ионного окружения, так и от особенностей первичной и вторичной структуры акцепторной ДНК. Имеющиеся данные позволяют считать, что гистоны H_3 и H_4 участвуют в функциональном сопряжении гормон-рецепторного комплекса с акцепторными сайтами ДНК, одновременно повышая сродство рецепторов к трийодтиронину и комплекса к специфическим локусам генома. Остается окончательно неясным, необходима ли наряду со специфическим взаимодействием гормон-рецепторного комплекса с определенными акцепторными местами ДНК общая дестабилизация хроматина, как это имеет место в случае стероидных гормонов.

3. Избирательно взаимодействуя с акцепторными локусами ДНК, гормон-рецепторный комплекс регулирует уровень синтеза соответствующих функциональных мРНК, а также тРНК.

4. Выходя из ядра после процессинга в цитоплазму, индуцированные РНК изменяют уровень синтеза кодируемых ими белков. В гипофизе они активируют синтез соматотропина, а в печени глицерофосфатдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, а также фракции глобулинов.

5. Нарушение взаимодействия гормон-рецепторных комплексов с гистонами в ядре уменьшает сродство рецепторов к ДНК и к трийодтиронину, поэтому вполне возможно, что частичное дегистонирование хроматина может быть одним из ведущих факторов терминации действия гормонов. Интересно, что если рецептор вывести из комплекса с гистонами хроматина, то рецепторный белок не только уменьшает свое сродство к трийодтиронину, но повышает его к тироксину. Не исключено, что дегистонированный комплекс, выходя из ядра в цитоплазму и специфически связывая тироксин, может регулировать его превращение в трийодтиронин и контролировать вступление последнего в новые рецепторные циклы в разных компартаментах клетки-мишени. Экстрануклеарные механизмы рецепции трийодтиронина изучены пока недостаточно.

Модели рецепции белково-пептидных гормонов и катехоламинов

В отличие от стероидных и тиреоидных гормонов белково-пептидные гормоны и катехоламины действуют на клетки-мишени через рецепторы, локализованные в плазматических мембранах. Они иницируют свои эффекты по трем основным путям, связан-

ным с разными типами акцепторов, обуславливающими соответственно образование соответствующих внутриклеточных медиаторов, которые опосредуют действие гормонов.

В настоящее время четко выявлены три пути действия сигнальных веществ (информонов) с клеточной поверхности: 1) аденилатциклазный, инициирующий физиологические эффекты информонов через аденилатциклазу и цАМФ; 2) кальциевый, инициирующий эффекты информонов через посредство кальциевых медленных, хемовозбудимых каналов и Ca^{2+} ; 3) протеазный, инициирующий эффекты информонов через посредство специфических мембранных протеаз ограниченного действия и специфические гликопептиды (рис. 5). Все эти пути в принципе способны реализоваться независимо друг от друга, однако в реальных физиологических условиях они могут быть тесно сопряжены (Розен, 1984).

А д е н и л а т ц и к л а з н ы й м е х а н и з м. Один из главных путей действия гормона с поверхности клеток осуществляется через взаимодействие гормон-рецепторных комплексов с мембранным ферментом аденилатциклазой. Этот фермент представляет собой олигомерный мембранный белок с молекулярной массой 150 кД, обуславливающий образование из Mg^{2+} АТФ или Mn^{2+} АТФ важнейшего внутриклеточного посредника цАМФ (Robison et al., 1971). В условиях максимальной гормональной стимуляции его концентрация в клетке увеличивается с 10^{-8} до 10^{-6} М уже через 1—5 мин.

Гормонзависимая аденилатциклаза является ферментом, который активируется многими гормонами, и в частности адреналином, гипоталамическими нейрогормонами, тропными гормонами гипофиза, вазопрессинном и т. д., в то время как гормональные рецепторы их специфичны. Различные рецепторы гормонов конвергентно замыкаются на аденилатциклазе, а передача специфического сигнала при этом осуществляется при обязательном участии специализированных факторов трансмембранного сопряжения гормон-рецепторного комплекса и фермента. К ним относятся ГТФ-связывающий белок (N-белок) или белки, ГТФ, катионы Mg^{2+} и Mn^{2+} и анионы F^{-1} , компоненты цитоскелета, микротубулы и микрофиламенты, кислые липиды мембран, некоторые ферменты. Гормон-рецепторные комплексы, аденилатциклаза и факторы их сопряжения составляют аденилатциклазную систему (Ткачук, 1981).

Основную роль в трансмембранном сопряжении играет полифункциональный ГТФ, связывающий N-белок (Ross, Gillman, 1977; Rodbell, 1980). Этот белок является необходимым посредником в активации аденилатциклазы гормон-рецепторным комплексом, без N-белка комплексы не активируют циклазу. Этот слабо гидрофобный белок состоит из 3 компонентов с молекулярной массой 35 (β), 42—45 (α) и 52 (γ) кД. Возможно, имеются и другие формы N-белка (Воейков, 1984). Субъединицы молекул белка имеют специфически связывающие центры для гормон-рецептор-

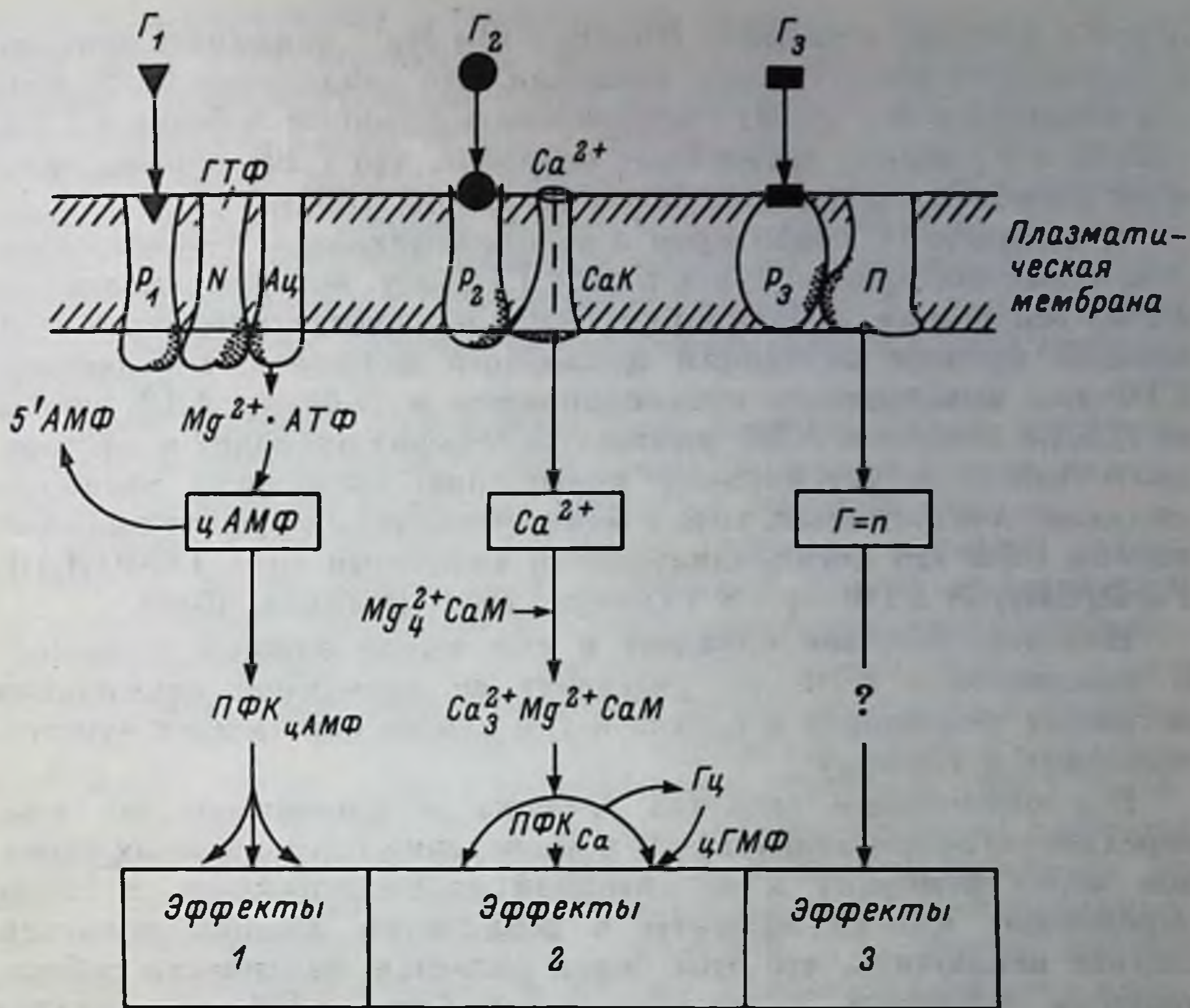


Рис. 5. Схема рецепции гормонов, действующих с поверхности клетки.

Γ — гормон, Π — рецептор, $A\alpha$ — аденилатциклаза, $\alpha AM\Phi$ — циклический аденозинмонофосфат. CaK — медленный кальциевый канал, CaM — кальмодулин, $Ca^{2+} + Mg^{2+} + CaM$ — кальций-магниевая (активированная) форма CaM , Π — специфическая мембранная протеаза ограниченного действия, $\Gamma-p$ — медиаторные гликопептиды, $ПФК$ — протеинфосфокиназа, $\Gamma\gamma$ — гуанилатциклаза.

ных комплексов, ГТФ, аденилатциклазы, Mg^{2+} и ГТФ-азы. По-видимому, первоначально взаимодействует с N-белком гормон-рецепторный комплекс, который непосредственно связывается с β -субъединицей N-белка. В результате этого значительно возрастает сродство N-белка к ГТФ за счет активации ГТФ-связывающего центра, входящего, вероятно, в состав α -субъединицы (Воейков, 1984).

Присоединение ГТФ приводит к тому, что в образовавшемся комплексе резко снижается сродство рецептора к гормону и гормон высвобождается, вступая в новый рецепторный цикл. Безгормональный комплекс активируется присоединением ГТФ и приобретает повышенное сродство к аденилатциклазе. Происходит активация фермента, значительное ускорение образования $\alpha AM\Phi$ и его накопление в клетке. Связывание соответствующим центром Mg^{2+} повышает сродство N-белка и к гормон-рецепторному комп-

лексу и к аденилатциклазе. Вместе с тем Mg^{2+} оказывает противоположный эффект. Раньше полагали, что аналогично ГТФ, хотя и в меньшей мере, может стимулировать функции N-белка и ГДФ, однако в последнее время было показано, что ГДФ, скорее, является ингибитором данного белка (Воейков, 1984).

В комплексе с рецептором и аденилатциклазой N-белок способен, вероятно, присоединять к себе ГТФ-азу, которая расщепляет ГТФ, тем самым инактивируя белок и аденилатциклазу и прекращая процесс активации циклазного фермента. Выключение ГТФ-азы ковалентным присоединением к N-белку АДФ-рибозы от НАД с помощью АДФ-рибозилтрансфераз приводит к «запираанию» цикла и устойчивому повышению активности аденилатциклазы. Аналогичный, хотя и менее устойчивый эффект вызывает замена ГТФ его негидролизуемыми аналогами типа ГФФ(H_2)Ф, ГФФ(CH_2)Ф, ГТФ— γ —S (Ткачук, 1981; Воейков, 1984).

Наконец, N-белок обладает и еще одной важной функцией. В комплексе с ГТФ он участвует во временной элиминации активных рецепторов в клетке и тем самым снижает их чувствительность к гормону.

Все отмеченные свойства N-белка обуславливают его универсальную сопрягающую роль в проведении гормональных сигналов через мембрану к акцепторной аденилатциклазе, а также определяют многие эффекты в реализации данного процесса. Нельзя исключить, что этот белок является фактически собирательным понятием, включающим семейство ГТФ-связывающих белков с разными независимыми функциями (Rodbell, 1980).

Следует отметить, что, как уже говорилось, в трансмембранном сопряжении гормон-рецепторных комплексов с аденилатциклазой участвуют элементы цитоскелета и мембранные кислые фосфолипиды.

Таким образом, происходит активация гормон-рецепторным комплексом аденилатциклазы, причем одна молекула комплекса может обуславливать образование 500 молекул цАМФ. Концентрация последнего зависит не только от активности аденилатциклазной системы, но и от фермента фосфодиэстеразы, локализуемого в цитозоле и расщепляющего активный 3', 5'-моонуклеотид до неактивного ациклического 5'-моонуклеотида. Активность этого фермента в физиологических условиях может регулироваться инсулином, соматотропином, соматомединами, хотя эффекты последних являются непрямыми. Образовавшийся в клетке цАМФ специфически взаимодействует с регуляторными субъединицами двух изоформ цАМФ-зависимых протеинкиназ. Регуляторные субъединицы (молекулярная масса 80—100 кД) вне гормональной стимуляции ассоциированы в холоферментах с каталитической субъединицей (молекулярная масса 40 кД) и ингибируют фосфотрансферазную активность последней (Robison et al., 1971). После связывания цАМФ с регуляторными субъединицами происходит диссоциация молекул фермента на мономеры. Вследствие этого «расторженная» каталитическая субъединица активиру-

ется и осуществляет в цитоплазме фосфорилирование целого ряда уже синтезированных функциональных и структурных белков. Фосфорилирование таких белков изменяет их активность или состояние. Таким образом активируются в клетках киназа фосфорилазы β , липаза, фосфолипаза, фосфопротейны рибосом, гистоны, ряд мембранных белков и т. д. (Robison et al., 1971). Вместе с тем комплекс цАМФ с одной из регуляторных субъединиц, по-видимому, способен транслоцироваться в ядро и оказывать избирательное влияние на активность генома и ряда ядерных ферментов.

Таким образом, цАМФ-зависимые протеинкиназы представляют собой универсальные акцепторные структуры клетки, являющиеся внутриклеточными посредниками действия гормона.

Следует отметить, что некоторые гормоны, а также нейромедиаторы, такие, как опиоды, дофамин и др., не стимулируют аденилатциклазу и образование цАМФ, а наоборот, ингибируют их, при этом необходим ГТФ, но в концентрациях на порядок выше, чем для стимуляции вышеуказанных процессов, а также катионы Na^+ , Li^+ или K^+ . Кроме того, в этом случае вовлекается не стимулирующий N-белок, а белок ингибиторный (Воейков, 1984). Необходимо также отметить, что некоторые стимулирующие эффекты гормонов могут вторично усиливаться и распространяться от клетки к клетке, благодаря образованию в гормонстимулированных клетках биологически активных соединений. В частности, многие гормоны, активируя циклазную систему, приостанавливают в клетках-мишенях образование простагландинов. Простагландины, выходя из клеток, где они образовались, способны действовать через собственные рецепторы на те же или на соседние клетки и также стимулировать аденилатциклазную систему.

На основании вышеизложенных данных последовательность основных событий в рецепции и многоступенчатой инициации стимулирующих эффектов ряда гормонов по аденилатциклазному пути можно представить поэтапно: 1) образование специфического гормон-рецепторного комплекса в плазматической мембране; 2) взаимодействие этого комплекса с N-белком, его активация ГТФ с выходом свободного гормона; 3) стимуляция комплексом аденилатциклазы; 4) усиленное образование цАМФ; 5) комплексообразование цАМФ с регуляторными субъединицами протеинкиназ и активация их каталитической субъединицы; 6) усиление фосфорилирования ряда белков с изменением их активности; 7) проникновение комплекса цАМФ-регуляторная субъединица протеинкиназы в ядро и инициация ядерных эффектов цАМФ. Терминация данного процесса может осуществляться, очевидно, на разных уровнях. На рецепторном уровне она может быть обусловлена объединением комплексов в крупные кластеры (шапки) в особых «окаймленных ямках» с последующей их интернализацией (переходом внутрь клетки). На уровне цАМФ терминация может быть обусловлена фосфодиэстеразой, на уровне фосфорилированных белков — соответственно фосфатазами.

Кальциевый механизм. Этот путь трансмембранного проведения гормонального сигнала включает активацию гормон-рецепторными комплексами медленных, неэлектрогенных кальциевых каналов плазматических мембран и подключение в качестве внутриклеточного посредника Ca^{2+} , усиленно входящего в клетку извне. Под действием многих нейрогуморальных стимулов содержание Ca^{2+} в цитозоле повышается с 10^{-8} — 10^{-7} до 10^{-5} М. Ряд гормонов, такие как либерины, тропные гормоны гипофиза, кальцитонин, паратгормон и др., одновременно действуют по Ca^{2+} и цАМФ-путям. Вместе с тем ангиотензины, окситоцин, лютеотропин, норадреналин действуют в основном через Ca^{2+} -каналы.

Структуры неэлектрогенных Ca^{2+} -каналов и их взаимодействие с гормон-рецепторными комплексами еще почти не охарактеризованы. Возможно, активация этих каналов обусловлена в какой-то степени распадом фосфоинозитола — фосфолипидного компонента плазматических мембран.

Последующие механизмы действия Ca^{2+} как внутриклеточного посредника действия гормонов на клетку в настоящее время интенсивно и успешно изучаются. Оказалось, что триггерным механизмом действия Ca^{2+} является комплексообразование последнего с особым Ca^{2+} -связывающим белком цитозоля кальмодулином (Тео, Wang, 1973). Этот полифункциональный белок выполняет роль универсального посредника эффектов Ca^{2+} , как цАМФ-зависимые протеинкиназы — эффектов цАМФ (Walsh et al., 1980). Функциональная универсальность и повсеместная распространенность этого белка в организме отличают его от других Са-связывающих белков, выполняющих более специализированные функции, а именно тропонина С, парвальбумина, белка мозга S-100 и др.

Кальмодулин — это гидрофильный кислый белок с молекулярной массой 16.5 кД и состоящий из 148 аминокислотных остатков. Молекула его имеет четыре связывающих места для Ca^{2+} . По этим же местам связывается и Mg^{2+} , содержащийся в клетке в концентрации 10^{-3} М. Однако по 3 сайтам кальмодулин связывает Ca^{2+} с константой ассоциации на три порядка выше, чем Mg^{2+} , а по одному сайту — лишь на 1.5 порядка выше, чем Mg^{2+} . Считается, что в покоящейся клетке кальмодулин содержится в неактивной тетрамагниевой форме. Под действием гормона, когда концентрация Ca^{2+} в клетке достигает 10^{-5} М, кальмодулин активируется (Walsh et al., 1980) и далее взаимодействует с несколькими типами клеточных белков — акцепторов, через которые индуцируются важнейшие Са-зависимые гормональные эффекты. Часть из них обусловлена прямым аллостерическим эффектом в отношении белков-акцепторов, таких, как аденилатциклазы, фосфодиэстеразы, тропонин и гуанилатциклазы. В последнем случае цГМФ выступает в качестве дополнительного медиатора Ca^{2+} , причем эффект последнего реализуется через цГМФ-зависимые протеинкиназы. Другая группа эффектов непосредственно связана с Ca^{2+} -зависимыми протеинкиназами и фосфорилированием ряда белков. Обычно эти ферменты независимы

от цАМФ. К ним относится киназа легких цепей миозина гладких мышц, участвующая в инициации гладкомышечного сокращения, саркоплазматическая киназа белка фосфоламбана, являющегося стимулятором Са-насоса, киназа, фосфорилирующая А-белок сарколеммы, возможно, участвующий в транспорте Ca^{2+} , особая киназа фосфорилазы β , зависящая от Ca^{2+} , но не от цАМФ, киназа мембранного белка липомодулина, регулирующего активность фосфолипаз.

Активный кальмодулин также влияет на фосфорилирование гистонов H_1 , сборку и распад микротрубок и микрофиламентов (Walsh et al., 1980). Обнаружено, что психотропные препараты типа фенотиозинпроизводных, избирательно связываясь с активированным кальмодулином, ингибируют его способность взаимодействовать с акцепторами и тормозят или даже выключают эффекты Ca^{2+} в клетке (Vincenzi, 1981).

Таким образом, этот механизм действия гормонов включает: 1) образование гормон-рецепторных комплексов в плазматической мембране; 2) взаимодействие образовавшихся комплексов с не-электрогенными Ca^{2+} -каналами и усиление вхождения Ca^{2+} в клетку; 3) образование активной формы кальмодулина с Ca^{2+} и Mg^{2+} ; 4) действие активированного кальмодулина на его множественные акцепторные сайты и включение множественных физиологических эффектов гормон-рецепторных комплексов; 5) завершение рабочего цикла рецепторов, связанных с Ca^{2+} -механизмом, пока неизвестным способом.

Протеазный механизм. Показано, что некоторые гормоны в комплексе с рецептором способны инициировать свои эффекты путем активации мембранных протеаз ограниченного действия. В результате активации акцепторных протеаз происходит образование одного или нескольких гликопептидов с молекулярной массой 1—2 кД, выполняющих функцию внутриклеточных медиаторов. Такой путь действия в последние годы изучен для инициации эффектов инсулина в разных клетках (Czech, 1982; Jarret et al., 1982; Lagner et al., 1982), не исключено, что он присущ также соматропину и соматомединам, однако в настоящее время изучение этих вопросов только начинается.

ЭЛИМИНАЦИЯ АКТИВНЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ИХ РАБОЧЕМ ЦИКЛЕ И ПРОБЛЕМА ДЕСЕНСИБИЛИЗАЦИИ КЛЕТОК К ГОРМОНАМ

Гормоны, как известно, с одной стороны специфически регулируют синтез и активацию определенных белков и тем самым избирательно моделируют работу клеток, а с другой стороны, после достаточно длительной или сильной экспозиции снижают чувствительность клеток к последующим порциям гормона вплоть до исчезновения к ним ответа. Второй процесс, являющийся обязательной стадией рецепторного цикла, получил название десенсibilизации (десенситизации, аутодеиндукции, рефрактер-

ности, тахифилаксии, толерантности, привыкания). Затем через определенный интервал времени после прекращения действия гормона происходит восстановление реактивности клетки иногда с проявлением некоторой гиперсенсibiliзации (Розен, Смирнов, 1981; Ткачук, 1981).

Установлено, что основное значение в механизме десенсибилизации имеет дозозависимая элиминация части рецепторов клетки, приводящая к их дефициту (Розен, Смирнов, 1981). Уровень элиминации может достигать 80—90 % от исходного количества рецепторов, при этом элиминируются рецепторы как участвующие, так и не участвующие в инициации регуляторных эффектов гормона. В случае стероидных гормонов временная инактивация рецепторов в их рабочем цикле может происходить как в ядре, так и, возможно, в цитозоле (Розен, Смирнов, 1981). Не исключено, что этот процесс происходит за счет дефосфорилирования рецепторных белков фосфатазами (Munk et al., 1972; Augicchio et al., 1982) и что гормон-рецепторные комплексы активируют фосфатазную активность, распространяющуюся как на рецепторы, связанные с гормонами, так и свободные рецепторы. Восстановление активности ядерных рецепторов, как уже упоминалось, возможно, связано с переходом KCl-растворимых форм в KCl-резистентные с последующим их фосфорилированием специфическими протеинкиназами.

Одной из наиболее вероятных причин элиминации мембранных рецепторов может быть процесс образования в плазматических мембранах больших кластеров последних с N-белком, накоплением этих кластеров в мембранных «окаймленных ямках» и последующей интернализацией кластеризованных рецепторов. Отшнуровавшиеся с поверхности и диффундирующие внутрь цитоплазмы клетки рецепторные кластеры затем либо поступают в лизосомы, либо переходят в форму водорастворимых молекул в цитозоле (Воейков, 1984). Не исключено, что восстановление активности рецепторов с их включением в толщу мембраны может быть обусловлено фосфорилированием интернализированных белков.

При некоторых формах десенсибилизации может изменяться состояние N-белка, сопровождающееся снижением его способности взаимодействовать с аденилатциклазой и рецепторными белками (Воейков, 1984). Проблема механизмов десенсибилизации клеток к гормонам и процессов рециклизации рецепторов находится в стадии весьма интенсивного изучения.

ПРОБЛЕМА ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ-ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЯ РЕЦЕПТОРОВ

В настоящее время некоторыми авторами высказывается предположение, что рецепция гормонов регулируется процессами фосфорилирования-дефосфорилирования на разных этапах.

1. Показано, что гормонсвязывающая активность некоторых

рецепторов, особенно в ряде типов клеток, усиливается и стабилизируется фосфорилированием рецепторных белков. Так, например, в присутствии АТФ и АТФ-генерирующей системы, а также неспецифических ингибиторов фосфатаз типа молибдата и глюкоза-1-фосфата происходит устойчивое повышение гормонсвязывающих свойств цитозольных рецепторов глюкокортикоидов и эстрогенов в некоторых клетках (Pratt et al., 1979; Abou-Issa et al., 1982). Вместе с тем в отсутствие АТФ-генерирующей системы или под влиянием щелочной фосфатазы гормонсвязывающая способность рецепторов резко снижается. На основании этих и многих других данных делается вывод о существенной роли не только свободных сульфгидрильных групп в молекуле рецепторов, о чем было известно ранее (Baulieu, 1975), но и фосфатных групп в поддержании их способности связывать гормон.

2. Обнаружено, что транслокация ряда рецепторов стероидных гормонов ингибируется некоторыми факторами. При этом фосфорилирование этих ингибиторов может не только снимать тормозящий эффект, но и усиливать переход гормон-рецепторных комплексов в ядро. Таким образом, фосфорилирование в некоторых случаях может способствовать транслокации рецепторов стероидных гормонов из цитоплазмы в ядро (Abou-Issa et al., 1982).

3. Выявлено, что дефосфорилирование ядерных рецепторов стероидных гормонов снижает их связывание с хроматином и гормонсвязывающую способность. Вместе с тем снижается и суммарное количество рецепторов в клетке, происходит их частичная элиминация. После фосфорилирования рецепторов, ранее дефосфорилированных, их активность полностью восстанавливается (Abou-Issa et al., 1982; Augicchio et al., 1982). Как уже отмечалось, химическая модификация рецепторных белков в форме дефосфорилирования-фосфорилирования их молекул может быть важным фактором в терминации рецепторного цикла, элиминации активных рецепторов и их рециклизации.

Аналогичные данные получены и для рецепторов белковых и пептидных гормонов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рецепторные белки гормонов являются необходимым звеном эндокринной функции в гормонреагирующих клетках. Рецепторы обеспечивают за счет специализированных структур их молекулы избирательный прием гормонального сигнала, его преобразование и тем самым перевод внеклеточного регуляторного фактора на язык клеточного метаболизма.

Выявлено несколько типов рецепции гормонов в зависимости от их структуры, локализации, характера акцепторных мест, инициирующих эффектов гормон-рецепторных комплексов и типа ответа клетки на гормоны. Так, установлены внутриклеточные и мембранные рецепторы. Первые преимущественно существуют либо в форме единой цитозольно-ядерной системы рецепторных

белков (рецепторы стероидных гормонов), либо в виде ряда независимых пулов ядерных (доминирующих) цитозольных, митохондриальных и, возможно, других рецепторов (рецепторы тиреоидных гормонов). Этот тип рецепции в обоих вариантах не требует на первых этапах внутриклеточных медиаторов и обуславливает главные эффекты гормонов за счет модуляции процессов транскрипции. Другой тип рецепторов расположен в толще плазматических мембран и определяет действие гормонов (катехоламинов и пептидных гормонов) через отдельные мембранные акцепторные структуры — аденилатциклазу, медленные кальциевые каналы и протеазы ограниченного действия. Изменение активности мембранных акцепторов приводит к модуляции синтеза внутриклеточных медиаторов действия гормонов, опосредующих гормональные эффекты в клетке. Соответственно это цАМФ, Ca^{2+} и специальные гликопептиды. Ряд гормонов, действующих с поверхности, может оказывать свое влияние на функции клетки разными путями, включая несколько акцепторов, например аденилатциклазу и кальциевые каналы. Одним из наиболее важных механизмов действия внутриклеточных медиаторов является быстрое изменение активности предсуществующих белков в клетке путем их химической модификации (фосфорилированием) или прямой аллостерической регуляции.

Показано, что рецепторы — это кислые крупномолекулярные олигомерные белки, имеющие асимметричную форму. Внутриклеточные рецепторы представлены в основном гидрофильными белками, а поверхностные — гидрофобными, трансмембранными белками.

Некоторые рецепторы уже достаточно хорошо очищены, и к ним получены антитела. Получение антител, и особенно моноклональных, к высокоочищенным рецепторам создает новые возможности для их количественного определения, изучения их свойств и физиологической роли.

В процессе рецепции белки претерпевают серию последовательных конформационных изменений, а гормонрецепторные комплексы обязательно взаимодействуют с экстрарецепторными факторами их сопряжения, с молекулами акцепторов. Для развития эффектов важным фактором является устранение влияния некоторых низко- или высокомолекулярных ингибиторов транслокации, а для осуществления взаимодействия рецепторов с белково-пептидными гормонами и катехоламинами необходимы N-белок, ГТФ, Mg^{2+} и некоторые другие факторы.

Установлено, что для одного и того же типа гормонов может существовать несколько форм рецепторов (мультирецепторная модель). Гетерогенность рецепторов, видимо, повышает избирательность действия гормонов на клеточные процессы.

Одной из наиболее актуальных в настоящее время является сложнейшая проблема механизмов включения и выключения акцепторных структур клеток. Другой не менее важной и интересной проблемой является изучение десенсибилизации и ресенси-

билизации клеток к гормонам. Установлено, что причиной по крайней мере многих форм десенсibilизации является временная дозозависимая элиминация большей части рецепторов при действии гормона. С этим, вероятно, связана и проблема фосфорилирования-дефосфорилирования рецепторных молекул, решение которой может иметь существенное значение в раскрытии механизмов реализации и терминации рецепторного цикла и изменения чувствительности клеток-мишеней к гормонам.

Л и т е р а т у р а

- Воейков В. Л. Сопряжение рецепторов гормонов и нейромедиаторов с аденилатциклазой. — В кн.: Итоги науки и техники. Биоорганическая химия. М., ВИНТИ, 1984, т. 2, с. 99—112.
- Кислинг С., Адлер В. В., Дмитриева Л. В., Мечитов В. И. и др. Участие плазматических мембран в переносе глюкокортикоидов в клетках печени. — Биохимия, 1980, т. 45, № 11, с. 2076—2082.
- Розен В. Б. Некоторые актуальные аспекты динамики стероидных гормонов. — В кн.: Итоги науки и техники. Физиология человека и животных. Физиология эндокринной системы. М., ВИНТИ, 1973, с. 49—107.
- Розен В. Б. Рецепция стероидных гормонов клеткой и принцип саморегуляции в инициации гормонального эффекта. — В кн.: Механизмы гормональных регуляций и роль обратных связей в явлениях развития гомеостаза. М.: Наука, 1981, с. 259—276.
- Розен В. Б. Основы эндокринологии. М.: Высшая школа, 1984, с. 173—207.
- Розен В. Б., Смирнов А. Н. Рецепторы и стероидные гормоны. М.: Изд-во МГУ, 1981, с. 79—210.
- Романов Г. А., Романов Н. А., Розен В. Б., Ванюшин Б. Ф. Глюкокортикоидрецепторные комплексы печени крыс. Кинетические и равновесные параметры их взаимодействия с ДНК: роль ионной силы и температуры. — Молек. биол., 1981а, т. 15, № 3, с. 601—612.
- Романов Г. А., Романов Н. А., Розен В. Б., Ванюшин Б. Ф. Глюкокортикоидрецепторные комплексы печени крыс. Взаимодействие с естественными и синтетическими полинуклеотидами. — Молек. биол., 1981б, т. 15, № 4, с. 857—873.
- Селезнев Ю. М., Данилов С. М., Волкова Н. Г. и др. Глюкокортикоиды в гормональной регуляции сердца. — В кн.: Метаболизм миокарда. М.: Медицина, 1981, с. 211—225.
- Ткачук В. А. Участие аденилатциклазы в проведении гормонального сигнала через мембрану. — Укр. біохім. журн., 1981, т. 53, № 2, с. 5—27.
- Трапкова А. А., Верещагина Г. В. Рецепторы тиреоидных гормонов. — Пробл. эндокриол., 1984, т. 30, № 4, с. 76—80.
- Abou-Issa H., Focking M., Minton J. Regulation of estrogen receptor binding by phosphorylation-dephosphorylation. — Fed. Proc., 1982, vol. 41, p. 1164—1167.
- Auricchio F., Migliaaccio A., Castoria G. et al. Evidence that in vivo estradiol receptor translocated into nuclei is dephosphorylated and released into cytoplasm. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1982, vol. 106, p. 149—157.
- Baulieu E.-E. Steroid receptors and hormone-receptivity: new approaches in pharmacology and therapeutics. — Mol. Pharmacol., 1975, vol. 24, p. 1743—1748.
- Blecher M., Goldstein S. Solubilization of liver plasma membrane glucagon receptors. — In: Hormone-receptor interaction: molecular aspects. N. Y.; Basel, 1976, p. 61—102.
- Bloudeau J., Baulieu E.-E., Robel P. Androgen-dependent regulation of androgen nuclear receptors in the rat ventral prostate. — Endocrinology, 1982, vol. 110, p. 1926—1932.
- Cidlowsky J., Thanassi J. Pyridoxal phosphate: a possible cofactor in steroid hormone action. — J. Steroid Biochem., 1981, vol. 15, p. 11—16.

- Comton J., Schrader W., O'Malley B. DNA sequence preference of the progesterone. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, p. 16—20.
- Czech M. Cellular dynamics of insulin action. — *Fed. Proc.*, 1982, vol. 41, p. 2717—2718.
- Czech M., Massague J. Cellular dynamics of insulin action. — *Fed. Proc.*, 1982, vol. 41, p. 2719—2723.
- Gorski J., Gannon F. Current models of steroid hormone action: a critique. — *Ann. Rev. Physiol.*, 1976, vol. 38, p. 425—450.
- Govindan M., Spiss E., Majons J. Purified glucocorticoid receptorhormone complex from rat liver cytosol binds specifically to cloned mous mammary tumor virus long-terminal repeats in vitro. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, p. 5157—5161.
- Jarret L., Kiechle F., Parker J. Chemical structure of mediators of insulin action: response to insulin and mode of action. — *Fed. Proc.*, 1982, vol. 41, p. 2736—2741.
- Jensen E., Jacobson H. Basic guides to the mechanism of estrogen action. — *Rec. Progr. Horm. Res.*, 1962, vol. 18, p. 387—414.
- Jensen E., Mhola S., Gorell et al. Estriphile to nucleophile in two ease steps. — *J. Steroid Biochem.*, 1972, vol. 3, p. 445—457.
- Jensen E., Green G., Closs L., De Sombre E. Estrophilin: pro and anti. — *Rec. Adv. Steroid Biochem.*, 1979, p. 15.
- Johnson L., Baxter J. Regulation of gene expression by glucocorticoid hormones. Early effects preserved in isolated chromatin. — *J. Biol. Chem.*, 1978, vol. 253, p. 1991—1997.
- Kahn C., Roth J. Insulin receptors in disease states. — In: *Hormone-receptor interaction: Molecular aspects*. N. Y.; Basel, 1976, p. 1—30.
- Kanazir D., Trajkovic D., Ribarac-Stepuc N. et al. Cortisol dependent acute metabolic responses in rat liver. — *J. Steroid Biochem.*, 1978, vol. 9, p. 467—476.
- Keefer D. Nuclear retention characteristics of ³H-estrogen by cells in four estrogen target region of the rat brain. — *Brain Res.*, 1981, vol. 229, p. 224—228.
- King W., Holt J., De Sombre E., Green G. Localization of estrogen receptor in rabbit target tissues using monoclonal antibodies to human breast cancer receptor. — *Fed. Proc.*, 1983, vol. 42, p. 612.
- Larner J., Cheng K., Schwartz C. et al. A proteolytic mechanism for the action of insulin via oligopeptide mediator formation. — *Fed. Proc.*, 1982, vol. 41, p. 2724—2729.
- Liao S., Liang T., Shao T., Tymoczko J. An androgen-receptor cycling in prostate cells. — In: *Receptors for reproductive hormones*. N. Y.; London, 1973, p. 232—240.
- Litwack G. Modulator and glucocorticoid receptors. — *Trends in Biochem. Sci.*, 1979, vol. 4, p. 217—223.
- Loceat F., Hai H., Milgrom E. Antibodies to rabbit progesterone receptor: crossreaction with human receptors. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, p. 1426—1429.
- Martin P., Sheridan P. Towards a new model for the mechanism of action of steroids. — *J. Steroid Biochem.*, 1982, vol. 16, N 1, p. 215—223.
- Moncharmont B., Parkin J. Binding of monoclonal antibodies to the nuclear estrogen receptor in intact nuclei. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 114, p. 107—112.
- Mulvihill E., Palmiter R. Relationship of nuclear estrogen receptor levels to induction of albumin and conalbumin mRHA in chick oviduct. — *J. Biol. Chem.*, 1977, vol. 252, p. 2060—2068.
- Munck A., Wira C., Young D. et al. Glucocorticoid-receptor complexes and the earliest steps in the action of glucocorticoids on thimus cells. — *J. Steroid Biochem.*, 1972, vol. 3, p. 567—578.
- Muroyama A., Fakai F. Studies on the molecular mechanisms of estrogen receptor translocation from the cytoplasm into the nuclei. — *J. Biochem.*, 1983, vol. 94, p. 511—519.
- Payvar F., Wrang O., Carlstedt-Duke J. et al. Purified glucocorticoid receptors binds selectively in vitro to a clonal DNA fragment those transcription is regulated by glucocorticoids in vivo. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, p. 6628—6632.

- Pratt W., Sando J., Nielsen C. Glucocorticoid receptor inactivation and activation by phosphorylation mechanisms. — In: Steroid hormone receptor system. N. Y.; London, 1979, p. 343—356.
- Robison G., Butcher R., Sutherland E. Cyclic AMP. N. Y., Acad. Press, 1971, 341 p.
- Rodbell M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transductions. — Nature, 1980, vol. 284, p. 17—22.
- Ross E., Gilman A. Reconstruction catecholamine sensitive adenilate cyclase activity: interaction of solubilized components with receptor-related membrane. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1977, vol. 74, p. 3710—3714.
- Schmidt T., Visek W. Sucrose density gradient characterisation of cytoplasmic (1,2-³H)-5 β -dihydrotestosterone binding proteins in the accessory sexual glands of the male syrian hamster. — J. Steroid Biochem., 1978, vol. 9, p. 317—324.
- Schrader W., O'Malley B. Structure of chick progesterone receptors. — Cancer Res., 1978, vol. 38, p. 4199—4203.
- Sherman M., Barzilai D., Pine P., Tuazon F. Glucocorticoid receptor cleavage by leupeptin-sensitive enzymes in rat kidney cytosol. — In: Steroid hormone receptor system. N. Y.; London, 1979, p. 357—376.
- Simons S., Schleenbaker R., Eisen H. Activation of covalent affinity labeled glucocorticoid receptor-steroid complexes. — J. Biol. Chem., 1983, vol. 258, p. 2229—2238.
- Surks M., Oppenheimer J. Isolation and characterisation of thyroid hormone receptors. — In: Hormone-receptor interaction: Molekular aspects. N. Y.; Basel, 1976, p. 373—384.
- Tata J. The receptors of thyroid hormone. — In: Cellular receptors for hormones and neurotransmitters. N. Y., 1980, p. 202—216.
- Taylor R., Smith R. Effects of highly purified estrogen receptors on gen transcription in isolated nuclei. — Biochemistry, 1982, vol. 21, p. 1781—1787.
- Teo T., Wang J. Mechanisms of activation of cyclic adenosin-3', 5'-monophosphate phosphodiesterase from bovine heart by calcium ions. Identification of protein activator as Ca⁺²-binding protein. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 5950—5955.
- Vincenzi F. The pharmacology of calmodulin antagonism. — In: Calmodulin and intracellular Ca⁺² receptors. N. Y.; London, 1981, p. 1—19.
- Walsh M., Peuch C., Vallet B. et al. Cardiac calmodulin and its role in the regulation of metabolism and contraction. — J. Mol. and Cell. Cardiol., 1980, vol. 12, p. 1091—1101.
- Yyenger R., Birnbaumer L., Schulster D. et al. Models of membrane receptor-sygnal coupling. — In: Cellular receptors for hormones and neurotransmitters. N. Y., 1980, p. 5—31.

Глава 2

ТРАНСРЕЦЕПТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ В ДЕЙСТВИИ КОРТИКОСТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О РЕЦЕПТОРАХ КОРТИКОСТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Специфическое связывание кортикостероидных гормонов в клетках-мишенях было обнаружено в конце 60-х годов при изучении их взаимодействия с тканью вилочковой железы (Hollander, Chin, 1966). Поскольку одним из выраженных влияний данных гормонов является стимуляция глюконеогенеза в печени, то вскоре рецепторное связывание было зарегистрировано и в этом органе (Beato et al., 1969). Затем рецепторы были найдены в сердце, почках, легких, молочной и поджелудочной железах, в селезенке, желудке и кишечнике, в периферической и центральной нервной системе (см. обзоры: Agarwal, 1977; Baxter, Rousseau, 1979; Кырге, 1981; Розен, Смирнов, 1981). Такое обширное представительство специфических рецепторов, с одной стороны, подчеркивает многообразие функций кортикостероидов, а с другой стороны свидетельствует о сложности взаимодействия этой группы гормонов с клетками-мишенями.

В большинстве клеток рецепторные белки составляют не более 0.01 % от общего содержания протеинов при концентрации связующих участков от 10^2 до 10^5 на клетку. Число связующих мест и концентрация рецепторов на единицу белка максимальна в гормонзависимых тканях, что свидетельствует об интегративной роли этого показателя при оценке гормональной чувствительности. Локализуются кортикостероидные рецепторы внутри клеток, по всей видимости, потому, что гормоны стероидной природы свободно диффундируют через мембрану, хотя не исключается и наличие их активного транспорта. В клетках основными местами локализации рецепторов является растворимая фракция цитоплазмы, т. е. цитозоль и клеточное ядро, что подтверждено как при субклеточном фракционировании, так и авторадиографически. В последние годы появились работы, доказывающие наличие

рецепторов стероидных гормонов и в мембране клеток, при этом предполагается, что мембранные рецепторы ускоряют проникновение гормонов в клетку (Szego, Pietras, 1981; Сергеев, 1984). Такого рода работы находятся лишь на самом начальном этапе, так же как и изучение вопросов рецепторного связывания кортико-стероидных гормонов фракцией микросом и митохондрий.

Рецепторы являются кислыми белками с точкой изоэлектрического фокусирования от 5.8 до 6.7 (Wrange, 1979). Очевидно, они составляют основную массу рецепторных молекул, хотя есть данные и о наличии в составе глюкокортикоидных рецепторов фосфолипидов (Schulte et al., 1983). Молекулярная масса рецепторов колеблется от 5 до 250 кД. Широкий разброс значений объясняется, по-видимому, тем, что часть рецепторов представляет собой мономеры более сложных молекул, которые в процессе выделения могут подвергаться частичному протеолизу (Miller, 1980). Следует отметить, что физические характеристики рецепторов зависят от свойств среды. При низкой ионной силе раствора значения массы рецепторов приближаются к верхней границе вариации, при повышении ионной силы среды до 0.3 M K^+ или Na^+ — к нижней. Низкой ионной силе среды соответствуют значения константы седиментации $7-9 \text{ S}$ и радиуса Стокса $4.5-5 \text{ нм}$, высокой — $3.5-4 \text{ S}$ и $3.5-4 \text{ нм}$ соответственно (Розен, 1984). Оптимум рецепторных свойств проявляется при $\text{pH } 7.2-8.0$, что и используется во всех работах по их идентификации. Большую роль играют кислородные атомы в молекуле гормона, которые не только участвуют в формировании водородных связей внутри самих молекул, но и определяют взаимодействие между гормоном и рецептором. Взаимодействие определяется также гидрофобными свойствами рецепторных белков, которые влияют, вероятно, не только на полярность рецепторных комплексов, но и на их способность диффундировать в клетках. Рецепторные белки весьма термолабильны. Прогревание при 40°C в течение нескольких минут приводит к полной утрате рецепторных свойств, хотя в соединении с гормоном устойчивость рецепторов существенно возрастает (Вахтер, Rousseau, 1979; Milgrom, 1981). Разные авторы находят приблизительно одинаковый, равный $4-5 \text{ ч}$ период полужизни рецепторов, выделенных из разных тканей при 0°C . При более высоких температурах скорость перехода рецептора из неактивной формы в активную возрастает, причем чем выше температура, тем короче время полужизни свободного рецептора, т. е. его активность. Возможно, что влияние температуры обусловлено потерей воды при взаимодействии гормона с рецептором.

В начале 70-х годов полагали, что взаимодействие стероидных гормонов с рецепторами не зависит от окислительного фосфорилирования. Такое мнение сложилось на основании данных об отсутствии чувствительности рецепторного связывания к недостатку кислорода или присутствию цианидов в среде инкубации. Однако в настоящее время эта точка зрения пересмотрена. Как оказалось, активация свободного рецептора, необходимая для

образования гормон-рецепторного комплекса, является АТФ-зависимым процессом. АТФ в концентрации 5—10 мМ замедляет инактивацию свободных рецепторов (Milgrom, 1981). АДФ, а также ГТФ, ЦТФ и УТФ не влияют на инактивацию свободных рецепторов кортикостерона, выделенных из фибробластов мышцы, но в тимоцитах крысы глюкокортикоидная рецепция под влиянием этих веществ несколько увеличивается, хотя и в меньшей мере, чем под влиянием АТФ (см. обзор: Bell, Muncsk, 1973).

Предотвратить инактивацию свободных рецепторов могут также фториды, соли ванадиевой, вольфрамовой и молибденовой кислот, которые являются ингибиторами фосфатаз (Bell, Muncsk, 1973). Одновременное присутствие в инкубационной среде АТФ и солей молибденовой кислоты оказывает более выраженный эффект, чем любое из этих веществ, взятое в отдельности. АТФ в присутствии молибдатов может активировать рецепторы, которые уже были инактивированы прогреванием. При прогревании инактивация рецепторов может быть вообще предотвращена, если в среде присутствовали ингибиторы фосфатаз. Инактивация предотвращается протекторами сульфгидрильных групп (Granberg, Ballard, 1977; Milgrom, 1981). Эффект этих веществ усиливается в присутствии ванадатов, вольфрамовых и молибдатов. Добавление в среду дитиотрейтола и молибдатов вызывает реактивацию инактивированных рецепторов.

В результате взаимодействия кортикостероидного гормона с активной формой рецептора образуется гормон-рецепторный комплекс. Чтобы иметь возможность транслоцироваться в ядро, он должен подвергнуться активации. В условиях *in vitro* это может быть достигнуто различными способами: прогреванием при 25—37 °С, повышением ионной силы среды выше 0.3 М раствором хлористого калия или натрия, добавлением в среду различных веществ: теофиллина, п-нитрофенола, п-нитрофенолфосфата. Активация гормон-рецепторного комплекса может быть предотвращена с помощью уже упоминавшихся АТФ и блокаторов фосфатаз — солей вольфрамовой, молибденовой или ванадиевой кислот (Litwack et al., 1980; Milgrom, 1981; Селезнев, 1982). Недавно из клеток тимуса и печени был выделен термостабильный фактор, препятствующий активации гормон-рецепторного комплекса и способствующий активации свободного рецептора (Leach et al., 1982). Природа этого агента пока не установлена.

Таким образом, в настоящее время можно считать твердо установленным, что при активации свободного рецептора происходит восстановление сульфгидрильных групп и фосфорилирование, которое может происходить если не в самой рецепторной молекуле, то в компонентах, тесно связанных с гормон-рецепторным взаимодействием. Активирование образовавшегося гормон-рецепторного комплекса происходит при дефосфорилировании и отщеплении термостабильного фактора. По всей вероятности, одновременно происходят и сложные конформационные перестройки.

Несмотря на то что по мнению большинства исследователей в ядро транслируется гормон, только связанный с рецептором, т. е. в форме гормон-рецепторного комплекса, не существует единого мнения о том, какая часть этого комплекса является наиболее существенной. Одним из возможных предположений является то, что основным компонентом, определяющим специфичность реакции, является молекула гормона, а рецептор выполняет только транспортную функцию и не участвует в процессах взаимодействия с ядерным материалом. Другое предположение состоит в том, что ведущую роль в реализации биологического ответа играет молекула самого рецептора, которая взаимодействует с ядерным аппаратом. В последние годы, в частности, показано, что в ядрах клеток обнаруживаются незанятые рецепторы, которые существуют в активной и неактивной формах, причем равновесие между ними, как и в цитоплазме, может быть сдвинуто присутствием свободного гормона, который, как считают авторы, проникая в клетку и связываясь с рецепторными молекулами, повышает их сродство к ядерным акцепторам, т. е. увеличивает их нуклеотропность (Jungblut et al., 1979).

В настоящее время точно не установлено, какова природа ядерного акцептора гормон-рецепторного комплекса. Показана возможность его прямой ассоциации с ДНК (Романов и др., 1984), с ядерными белками, с т-РНК, с РНК-полимеразой, с хроматином (Розен, Смирнов, 1981; Розен, 1984). В хроматине выявлены конформационные изменения, обусловленные, по всей видимости, их дефосфорилированием (Розен, Смирнов, 1981).

Согласно мнению одних авторов связывание комплекса с ДНК происходит без узнавания специфических нуклеотидных последовательностей. Другими исследователями выдвинуто предположение о том, что гормон-рецепторный комплекс связывается лишь с определенными участками ДНК, с чередующимися определенными основаниями. Последнее предположение получило подтверждение, когда было установлено, что гормон-рецепторный комплекс, образованный кортикостероидными гормонами, избирательно связывается с теми участками ДНК, транскрипция которых находится под влиянием кортикостероидных гормонов в условиях *in vitro* (Romanov et al., 1984). По всей вероятности, существует одновременно два типа взаимодействия гормон-рецепторного комплекса с ядерным материалом. Первый тип — это насыщаемое, специфическое связывание с конечным числом участков ДНК, регулирующих активность гормонзависимых генов; второй тип — это ненасыщаемое связывание с различными компонентами хроматина, регулирующее интенсивность эффекта специфического связывания (Розен, Смирнов, 1981). Следует сказать, что кортикостероидные гормоны не только влияют на ядерный аппарат клетки, но также способны изменять экспрессию митохондриального генома (см. обзор: Комиссаренко, 1982), причем, как и в ядре, кортикостероиды проникают в митохондрии только в форме комплекса с рецептором.

Основным свойством рецепторов является стереоспецифичность, т. е. способность избирательно связывать соответствующие стероиды. Это обуславливает дискриминированный прием гормонального сигнала, характерного для разных групп кортикостероидных гормонов. В 1972 г. Руссо и Бакстер (Rousseau et al., 1972) разделили кортикостероидные гормоны на несколько групп по их биологическому действию и способности связываться с рецепторами. В первую группу они отнесли оптимально активные индукторы, вызывающие при максимальной насыщенности рецепторов наибольший ответ. В нее были отнесены дексаметазон, кортикостерон, кортизол и альдостерон, которые по своей способности связываться с рецепторами являются агонистами. Менее активными оказались такие соединения, как 21-дезоксикортикостерон, 21-дезоксикортизол, 11 α -гидроксипрогестерон и 11 α -гидроксиортизол, которые в концентрациях, насыщающих рецепторы, не давали выраженного эффекта, но предотвращали влияние оптимальных индукторов. В отдельную группу были выделены антииндукторы, одновременно угнетающие биологическую активность глюкокортикоидов и их рецепцию. Такими свойствами отличались кортизон, прогестерон, тестостерон, т. е. вещества, обладающие антагонистическими по отношению к кортизолу и кортикостерону свойствами.

После того как рецепторы кортикостероидов были обнаружены в разных органах у различных биологических видов, встал вопрос о том, опосредуется ли все многообразие гормональных эффектов одной и той же рецепторной молекулой, или же эти молекулы гетерогенны. К настоящему времени накоплено много фактов, подтверждающих существование такой гетерогенности. Одним из доказательств ее является наличие различных путей реализации гормонального эффекта. Так, глюкокортикоиды вызывают в тимусе уменьшение синтеза белка, а в печени — увеличение (Thompson, Lippman, 1974). О том, что в одной и той же ткани существуют разные рецепторы, говорит также разная скорость активации тирозинаминотрансферазы и триптофаноксигеназы в печени под влиянием кортикостероидов. Кроме того, эффекты разных гормонов по-разному предотвращаются ингибиторами трансляции. К примеру, актиномицин Д снимает блокирующий эффект дексаметазона, но не кортикостерона на гипофиз-адреналовую систему (Portanova, Sayers, 1974). И, наконец, еще одним, наиболее убедительным доказательством гетерогенности рецепторных молекул служат различные свойства рецепторов, выделенных из одного и того же органа (Розен, 1984). В печени при хроматографическом разделении белков, связывающих кортикостероиды, первоначально было выделено только две фракции, одна из которых была идентифицирована с транскортином с помощью иммунологических методов. В последующих работах указывалось на существование 3 фракций, одна из которых связывала как натуральные, так и синтетические кортикостероиды, вторая — только натуральные и третья — только синтетические.

В последующие годы выделяется четыре или пять фракций, что определяется методикой их выделения. При хроматографии на ДЭАЭ-целлюлозе из печени крысы было получено четыре фракции, а при использовании фосфоцеллюлозы — пять (см. обзор: Agarwal, 1977). Несколько типов рецепторов гидрокортизона обнаружено и в клеточной мембране (Szego, Pietras, 1981).

Вопрос о гетерогенности рецепторов осложняется тем, что большинство известных рецепторов не обладает абсолютной специфичностью к одному определенному стероиду. Например, рецепторы альдостерона, выделяемые из почек, головного мозга, сердца могут связывать также и дексаметазон. Рецепторное связывание дексаметазона и кортикостерона частично подавляется 17-эстрадиолом, 11-метоксиэстрадиолом, прогестероном и другими стероидами. В то же время эти гормоны имеют собственные рецепторы в тех же тканях. В связи с этим трудными для интерпретации являются такие факты, как подавление глюконеогенеза в печени половыми стероидами, влияние глюкокортикоидов на транспорт натрия в почках, подавление прогестероном влияния кортикостероидов на тимус.

Что касается количества рецепторов кортикостероидных гормонов в клетках-мишенях, то эта величина не является постоянной. Число рецепторов изменяется в зависимости от пола, возраста, различных биологических ритмов, уровня тиреоидных гормонов и кортикостероидов в плазме крови или в культуральной среде.

Формированию рецепторов кортикостероидных гормонов в онтогенезе посвящено значительное число работ. У крыс в печени, желудке, кишечнике, легких и нервной ткани рецепторное связывание кортикостероидов удается выявить за несколько дней до рождения. Поскольку константа ассоциации гормон-рецепторного комплекса у новорожденных резко снижена по сравнению с зародышами и взрослыми животными, такое снижение может быть связано с занятостью рецепторов эндогенными кортикостероидами, концентрация которых резко возрастает во время родов. Уже через два часа после рождения отмечается значительное увеличение рецепции дексаметазона в печени, а плато по данным одних авторов достигается к 6-му дню жизни (Giannopoulos, 1975), по данным других — к 15-му дню и сохраняется до 40-го дня (Grote et al., 1977). У взрослых животных некоторые авторы отмечали снижение рецепции по сравнению с рецепцией месячных животных (Giannopoulos, 1975).

В кишечнике и желудке содержание рецепторов кортикостероидов растет до 10-го дня жизни, а затем снижается до пренатального уровня. В легких максимум кортикостероидной рецепции отмечен на 1—2-й день жизни, после чего она снижается. Развитие кортикостероидной рецепции коррелирует с онтогенезом биологического эффекта гормона. В печени активность аланин-аминотрансферазы развивается параллельно росту рецепторов, как и синтез РНК, вызванный кортикостероидами. Как базальная, так и вызванная введением кортикостероидов активность тирозин-

аминотрансферазы и триптофаноксигеназы в печени изменяется с возрастом параллельно с изменением числа рецепторов. Следует отметить, что онтогенез рецепторов разных типов различен и каждый из двух ферментов изменяет в онтогенезе свою активность параллельно определенному типу рецепторов (Grote et al., 1977). Подъем рецепторного связывания в легких, по-видимому, имеет отношение к формированию сурфактанта в альвеолах, которое происходит в это же время. Но для рецепторов кортико-стероидов в пищеварительном тракте пока не обнаружено связи с биологическим эффектом в онтогенезе, так как естественный отъем от матери происходит на 4-й неделе жизни, а рецепция кортикостероидов начинает снижаться уже с 10-го дня. В то же время число рецепторов в молочной железе коррелирует с периодом вскармливания. Содержание как цитозольных, так и ядерных рецепторов начинает возрастать с 12-го дня беременности и выходит на плато в день родов. При этом изменяется не только количество рецепторов, но и их коэффициент седиментации (Lindenbaum, Chatterton, 1981).

Суточная ритмика рецепторов изучена мало. По мнению одних авторов существенных изменений числа рецепторов в течение суток не наблюдается, а по мнению других оно меняется (Angelucci et al., 1980). Согласно последнему автору, с утра у крыс рецепторов больше, а к вечеру, когда активность гипофиз-адреналовой системы увеличивается, число рецепторов снижается.

Изменение числа кортикостероидных рецепторов как в ядрах, так и в цитоплазме происходит во время клеточного цикла, что установлено на синхронной культуре клеток. Максимальное число рецепторов регистрируется в интерфазе, когда наибольшей является активность мРНК и процессов белкового синтеза, минимальное — в митотическую фазу цикла. Во время клеточного цикла изменяется содержание различных типов рецепторов. Во время фаз S и поздней G₁ на ДЭАЭ-целлюлозе выделяется только один тип рецепторов. В фазах G₂ и ранней G₁ появляется добавочный пик связанной радиоактивности (Cidlowski, Cidlowski, 1981).

Одним из основных видов регуляции числа рецепторов в клетке-мишени является регуляция по уровню гормона. При введении экзогенного гормона число цитозольных рецепторов снижается. При использовании физиологических доз этот процесс является дозо- и времязависимым, при этом степень и длительность истощения пула цитоплазматических рецепторов соответствует степени активации гормонзависимых ферментов (Izawa et al., 1982). Через определенное время после введения гормона в организм исходный уровень цитоплазматических рецепторов восстанавливается, но с повышением дозы срок восстановления удлиняется.

Неясным до сих пор остается механизм снижения числа гормональных рецепторов, вызванного введением гормона. В работах, посвященных этому вопросу, предварительно введенный гормон обнаруживается в тканях-мишенях в следовых количествах,

кроме того, аргументом в пользу снижения общего числа рецепторов, а не только свободных, является неизменная константа диссоциации гормон-рецепторного комплекса, образующегося при тестирующем введении гормона (Tsukanaka et al., 1981). Если гормон не образует с рецептором ковалентных недиссоциирующих связей, а это до сих пор не обнаружено, то тогда неизменная величина константы диссоциации свидетельствует о том, что число занятых мест связывания не изменилось, и уменьшение количества связанного гормона объясняется снижением общего числа рецепторов.

Снижение числа рецепторов наблюдается и при исследованиях в условиях *in vitro*. Преинкубация культуры гормонзависимых клеток с дексаметазоном в течение 24 ч с последующей тщательной отмывкой от гормона приводит к уменьшению числа цитозольных и ядерных рецепторов. Константа диссоциации и физико-химические свойства рецепторов в этих клетках остаются неизменными по сравнению с контролем (Cidlowski, Cidlowski, 1981). Если снижение числа рецепторов является следствием увеличения количества гормона, то снижение концентрации гормона в окружающей среде приводит к росту числа рецепторов. Адреналэктомия вызывает значительное увеличение числа рецепторов в тканях (Baxter, Rousseau, 1979).

Количество рецепторов изменяется и под влиянием нервных факторов. После иммобилизационного стресса отмечается снижение связывания кортикостерона в миокарде, так же как и после хронической и физической нагрузки. Было при этом отмечено, что константа ассоциации гормон-рецепторного комплекса не изменялась, т. е. снижение числа рецепторов происходило не за счет занятости мест связывания эндогенными гормонами (Голиков и др., 1983).

Трансрецепторные механизмы действия кортикостероидов на физиологические и метаболические процессы

Как и все гормональные вещества, кортикостероиды являются первичными мессенджерами в своем физиологическом действии на организм. Они свободно проходят через клеточную мембрану и взаимодействуют с цитоплазматическими и ядерными рецепторами, реализуя через них свои биологические эффекты. Вопрос о мембранных влияниях кортикостероидных гормонов до сих пор не решен, так же как и вопрос о наличии на мембранах клеток стероидных рецепторов, тем не менее их действие на мембрану зарегистрировано. Стероидные гормоны, в частности, влияют на проницаемость мембран, и это зависит от строения и конформационных изменений молекул (Сергеев, 1984). С действием на проницаемость мембран связывается и влияние гормонов на ионный транспорт (Митюшов и др., 1976), хотя оно может быть обуслов-

лено активным переносом с участием транспортной АТФазы. По всей видимости, мембранными эффектами могут определяться быстрые, исчисляемые долями секунды электрофизиологические сдвиги в нейрональной активности, зарегистрированные микроэлектродной техникой. Глюкокортикоиды действуют на лизосомы, богатые гидролитическими ферментами, необходимыми при воспалительных процессах. Они стабилизируют мембрану лизосом в концентрациях 10^{-6} М, а также меняют мембранные свойства эритроцитов, однако сущность всех этих влияний не расшифрована.

Более ясным с точки зрения гормон-рецепторного взаимодействия является влияние кортикостероидных гормонов на обмен белков. В разных дозах они неоднозначно действуют на синтез и деградацию белков, хотя в целостном организме оказывают катаболическое влияние. Кортикостероиды в больших дозах усиливают распад белков и тормозят их синтез, тормозят синтез ДНК, снижают поглощение аминокислот, а также жирных кислот и глюкозы. Все эти эффекты обусловлены трансрецепторными механизмами, локусы которых располагаются внутри клеток, в основном в ядерных белках. Свойством этих рецепторов и их числом в различных органах и тканях, по-видимому, следует объяснить и то разнообразие эффектов, которое оказывают стероидные гормоны на различные органы и ткани. Ядерные рецепторы стероидоспецифичны и имеют свою кинетику связывания, что и обуславливает их специфичность для каждого вида ткани и для каждого вида животных.

Неоспоримо доказано, что связывание стероидов с ядерными рецепторами регулирует синтез РНК. Это определяется тем, что ядро является основным местом образования рибосомальной РНК, которая, комплексируясь затем с белками цитоплазмы, служит субстратом для сборки рибосом. Стимуляция синтеза РНК является самым быстрым проявлением в действии стероидов. Выраженное повышение содержания РНК может быть обнаружено уже через 10 мин после действия кортизола (Baxter, Rousseau, 1979). Стероидные гормоны стимулируют синтез разных видов РНК: ядерной, информационной, рибосомальной, транспортной. Первичной точкой приложения в действии стероидных гормонов при этом является процесс транскрипции генетической информации с матриц ДНК на РНК. Возможно, что первичной реакцией является активация ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Несколько позже появляется эффект на синтез белков, в частности белков-ферментов. Стероиды индуцируют синтез тирозинаминотрансферазы, триптофаноксигеназы, аланинаминотрансферазы и других ферментов. Таким образом, транслокация стероид-рецепторного комплекса в ядро определяет активность многих генов, ответственных за продукцию белковых молекул, необходимых для клеточных функций.

Глюкокортикоидам присуще влияние на углеводный обмен. При введении в организм они повышают толерантность к глюкозе,

вызывают гипергликемию, угнетают поглощение глюкозы и превращение в глюкозу неуглеводных субстратов (Thompson, Lippman, 1974). При стрессе глюкокортикоиды усиливают глюконеогенез, реализуя свободные жирные кислоты и глицерин, аминокислоты и нуклеиновые кислоты. Все ферменты глюконеогенеза стимулируются глюкокортикоидами в печени, и в частности фосфоэнолпируваткарбоксилаза, фруктозо-1,6-дифосфотаза и т. д. Глюкокортикоиды усиливают липолиз и изменяют метаболизм в жировых клетках.

В последнее время показано, что кортикостероиды тормозят синтез мембранного переносчика гексоз, развитие клеточного цикла. Это открывает возможности для изучения роли этих гормонов в патогенезе опухолевого роста и лечения опухолей стероидными гормонами (Agarwal, 1977; Baxter, Rousseau, 1979; Розен, Смирнов, 1981).

Трансрецепторные влияния кортикостероидов лежат в основе противовоспалительного и иммуносупрессивного действия. Рецепторы кортикостероидов идентифицированы сейчас в иммунокомпетентных клетках в лимфоцитах, моноцитах, макрофагах, фибробластах (см. обзоры: Agarwal, 1977; Baxter, Rousseau, 1979). Путем изучения стероидных рецепторов в лимфомах у мышей удалось показать, что их наличие или отсутствие определяет стероидчувствительность или резистентность тканей к гормонам. Большинство эффектов стероидов осуществляется через активацию клеточного генома и генные механизмы, включая действие гормонов на развитие клеток и их дифференцировку.

В настоящее время интенсивно развивается положение, что гормональные рецепторы играют большую роль в патогенезе многих эндокринных и неэндокринных заболеваний (Розен, 1984). Доказательство такой важной в практическом плане концепции могло бы способствовать поиску путей эффективной борьбы с болезнями и способов их диагностики путем изучения тканевой стероидной рецепции. У людей изменение стероидной рецепции выявлено как при лимфобластической, так и миелогенной лейкемии, а также при опухолевом росте в репродуктивной системе и ткани мозга. Установлена также большая роль глюкокортикоидных рецепторов в генезе респираторных заболеваний у новорожденных, связанных с изменением содержания сурфактанта. Все эти вопросы подробно освещены в обзоре Контула (Kontula, 1980).

Возможны перестройки кортикостероидной рецепции и у практически здоровых людей. Описана, в частности, семейная наследуемая форма кортикостероидной резистентности без каких-либо видимых проявлений синдрома Кушинга. У этих пациентов отмечены признаки гипертензии и гипокалиевого алкалоза. Биохимически у них определено увеличение уровня кортикостероидов и АКТГ, наступившее, по всей видимости, вследствие изменения регуляции аденогипофиза по механизму обратной связи. Возможно, что скрытые дефекты кортикостероидных рецепторов могут иметь место и при других патологических сдвигах, а также при

различных изменениях гормонального статуса, имеющих место в раннем онтогенезе. Выяснение всех этих вопросов представляет сейчас одну из важных задач эндокринологии.

Рецепторы кортикостероидов в центральной нервной системе

Давно известно, что кортикостероидные гормоны оказывают выраженное влияние на центральную нервную систему. Этому были посвящены многочисленные исследования в 60—70-х годах, обобщенные в ряде обзоров и монографий (Agarwal, 1977; Angelucci et al., 1980; Комиссаренко и др., 1982). С работ Селье внимание исследователей привлечено к важной роли кортикостероидов в контроле адаптивного поведения. При этом было выяснено, что гормоны усиливают распознавательную деятельность и облегчают избегание, изменяют порог чувствительности к сенсорным стимулам и способствуют угашению ориентировочных реакций и мотиваций (Angelucci et al., 1980). Выявлена прямая взаимосвязь между уровнем секреции кортикостероидов и двигательной активностью как у взрослых животных, так и в раннем онтогенезе (Чемыртан, 1983). При введении в организм в раннем неонатальном или перинатальном онтогенезе кортикостероиды меняют процессы развития мозга в зависимости от стадии его дифференцировки.

Уже давно хорошо известно, что функция коры надпочечников регулируется гипофизом и различными структурами головного мозга. В последние годы возрос интерес к обратному процессу: как кортикостероидные гормоны влияют на нервную ткань. Особенно актуален этот вопрос в связи с проблемами регуляции гипофиз-адреналовой системы по механизму обратной связи.

При развитии стрессорной реакции, характеризующейся в первую очередь интенсивным выделением кортикостероидов в кровяное русло, значительно изменяются электрофизиологические характеристики реакций нейронов в различных отделах центральной нервной системы (Филаретов, 1979). Эти изменения зависят от формирования стрессорной реакции, а также возникают вторично, в связи с влиянием кортикостероидов на нервные клетки. Системное введение кортикостероидов животному изменяет реакции большого числа нейронов во многих структурах лимбической системы, в том числе в гиппокампе, миндалинах, гипоталамусе (Dafny et al., 1973). При непосредственном воздействии кортикостероидами на нервную клетку путем микроэлектрофоретической аппликации также зарегистрировано изменение нейрональных реакций. Большинство авторов отмечают преимущественно и даже исключительно тормозный эффект кортикостероидов на электрическую активность нервных клеток. Так, микроэлектрофоретическое подведение кортизола в туберальную область гипо-

таламуса приводит к подавлению спонтанной активности большинства клеток. Клетки дорсального гиппокампа также снижают частоту импульсации при аппликации дексаметазона. Причем этот эффект имеет дозозависимый характер в пределах физиологических концентраций. Преимущественно тормозный эффект кортикостероидов отмечается и при их системном применении (Филаретов, 1979). Нейроны продолговатого мозга, моста, ретикулярной формации промежуточного мозга реагировали учащением или урежением примерно с равной вероятностью на аппликацию кортикостерона и кортизола.

В исследованиях, проведенных на бодрствующих кроликах, отмечается некоторое преобладание возбуждающего эффекта кортикостерона и кортизола на нейроны гиппокампа и гипоталамуса (Белый, 1980).

Изменение электрической активности при электрофоретической аппликации кортикостероидов происходит очень быстро, с латентным периодом от 1 до 10 с. Разными авторами отмечается изменение реакций у 20—80 % зарегистрированных клеток. Таким образом, твердо установлено, что кортикостероиды могут влиять на активность нервной ткани.

Нервная ткань, и в частности головной мозг, обладает способностью накапливать кортикостероидные гормоны. Кортикостероиды могут быстро проникать через гематоэнцефалический барьер путем простой диффузии или же взаимодействуя со специфическими образованиями на клеточной мембране (Baxter, Rousseau, 1979; Кырге, 1981).

В 1968 г. Мак-Ивен с соавт. (McEwen et al., 1968) установили, что большая часть введенного кортикостерона обнаруживается в структурах лимбической системы, в частности в гиппокампе. Весьма существенным в этой работе было обнаружение факта ограниченной емкости поглощения, который состоит в том, что по мере увеличения дозы вводимого гормона его содержание в тканях быстро достигает определенного предела и увеличивается в дальнейшем незначительно.

Авторадиографические исследования подтвердили преимущественный характер накопления кортикостероидов в лимбических структурах мозга, в первую очередь в гиппокампе. В нем метка находится главным образом в пирамидных нейронах полей CA₁ и CA₂ аммонова рога, а также в гранулярных нейронах зубчатой фасции и субикулуме. В слоях CA₃ и CA₄ метки значительно меньше, причем в полях CA₁ и CA₂ плотность больше и по средней интенсивности метки, и по числу меченых нейронов. Слои CA₁ и CA₂ отличаются от прочих областей еще и тем, что кортикостероиды задерживаются в них больше, чем в других областях. Через 2 ч после инъекции гормона плотность в них такая же, как и через 1 ч, тогда как в CA₃ и CA₄, миндалях, коре головного мозга, обонятельной луковице плотность метки через полтора часа заметно меньше, чем через 1 ч после введения гормона (Wagembourg, 1977).

Кроме упомянутых структур, метка при автордиографическом исследовании обнаруживается в гипоталамусе, в гипофизе, в нейронах варолиевого моста, в моторных ядрах среднего и продолговатого мозга, в ретикулярной формации и спинном мозге (Stumpf, Sar, 1979). При обычно принятом часовом интервале от введения гормона до забоя животного метка во всех структурах располагается над ядрами клеток, и лишь в переднем гипофизе при введении кортикостерона метка распределяется примерно поровну между ядром и цитоплазмой. Если одновременно с меченым гормоном адrenaлэктомированным животным вводится большое количество немеченого кортикостерона, плотность метки падает в 10 раз (Wagembourg, 1977), что свидетельствует о специфическом, рецепторном характере связывания этого гормона в мозге.

Рецепторы, специфически связывающие натуральные и синтетические кортикостероиды, были выделены из всех мозговых отделов как грызунов, так и человека. И хотя их свойства и физико-химические характеристики схожи со свойствами рецепторов, выделенных из других тканей млекопитающих (Wrange, 1979), были обнаружены некоторые различия в распределении натуральных и синтетических кортикостероидных гормонов в различных участках мозга. Если *in vitro* кортикостерон связывается в ядерной фракции гиппокампа примерно так же, как и дексаметазон, то в аденогипофизе ядерное связывание дексаметазона значительно больше, чем кортикостерона. В то же время в условиях *in vivo* в гипофизе отмечается такое же соотношение связывания кортикостерона и дексаметазона, а в гиппокампе ядерное связывание кортикостерона значительно больше, чем дексаметазона (Вахтер, Rousseau, 1979). Такие различия в данных, получаемых в разных условиях эксперимента, могут объясняться различной способностью гормонов проникать через гематоэнцефалический барьер. Возможно, что в условиях целостного организма в процессах проникновения гормона в клетку и его связывания участвуют некие вспомогательные системы, формируемые на основе, например, глиальных элементов. Так, установлено, что содержание радиоактивных кортикостероидов в миелинизированных волокнах во много раз больше, чем в немиелинизированных (Meuer et al., 1982). Показана способность глиальных элементов избирательно связывать кортикостероидные гормоны. Кроме того, подобные различия могут быть объяснены существованием различных типов рецепторов.

В настоящее время установлено наличие в мозгу по крайней мере трех типов рецепторов (Агагвал, 1977), хотя их может быть и больше. Одна из фракций, связывающих в клетке кортикостероиды, идентифицируется с кортикостероидсвязывающим глобулином плазмы — транскортином (Koch et al., 1981). Две другие фракции различаются по своей способности связывать глюкокортикоиды и минералокортикоиды. Один тип рецепторов имеет высокое сродство к глюкокортикоидам и низкое — к минералокортикоидам, а другой — наоборот.

Различия в свойствах позволяют объяснить и некоторые особенности связывания натуральных и синтетических кортикостероидов мозгом и гипофизом. «Истинный», транслоцирующийся в ядро рецептор иногда называют дексаметазоновым рецептором, так как он с высокой степенью связывает как натуральные, так и синтетические кортикостероиды типа дексаметазона и триамсинолона. Другой тип рецепторов, называемый транскортиноподобным, как и транскортин плазмы млекопитающих, связывает только натуральные кортикостероиды и по своим свойствам очень близок, если не идентичен, транскортину. Рецептор образует с кортикостероидами комплексы, которые не способны активироваться и транслоцироваться в ядро (Koch et al., 1981). Эти два типа рецепторов различаются прежде всего по своему распределению в мозгу и гипофизе. Транскортиноподобный рецептор во всех структурах мозга присутствует в незначительных количествах, тогда как в гипофизе его примерно столько же, сколько и дексаметазонового рецептора. Дексаметазоновый рецептор находится в цитоплазме клеток различных отделов мозга примерно в одинаковом количестве (Alexis et al., 1983). Этим и объясняется то, что кортикостерон и дексаметазон по-разному подавляют связывание друг друга в цитоплазме гипофиза. Избыток меченого кортикостерона подавляет связывание меченого дексаметазона полностью, так как кортикостерон способен занимать и те и другие рецепторы, а избыток дексаметазона лишь частично снижает количество связанного кортикостерона, поскольку дексаметазон не может связаться с транскортиноподобным рецептором. Эти два типа рецепторов различаются не только по их специфичности, но и по ряду физико-химических свойств (Koch et al., 1981). Так, при низкой ионной силе среды коэффициент седиментации транскортиноподобного рецептора не бывает выше 4 S, а дексаметазоновый рецептор имеет коэффициент 7—9 S.

Транскортиноподобный рецептор не способен связываться с изолированными ядрами и ДНК-целлюлозой, он стабилен при 40 °С, тогда как дексаметазоновый теряет свои рецепторные свойства. Протекторы сульфгидрильных групп типа дитиотрейтола стабилизируют связывающую способность дексаметазонового рецептора и не влияют на транскортиноподобный. Не отмечается половых различий в содержании и распределении дексаметазонового рецептора, тогда как они существуют для транскортиноподобного рецептора.

Транскортиноподобный рецептор сходен по своим свойствам с транскортином. Показана даже их иммунологическая идентичность. Большинство авторов полагают, что наличие в тканях транскортиноподобного рецептора не является артефактом, вызванным загрязнением препарата плазмой крови, по крайней мере в отношении аденогипофиза. Лишь одним из исследователей транскортиноподобный рецептор не был обнаружен в печени (Wrange, 1979), в отличие от многочисленных свидетельств о его наличии.

Изменение концентрации транскортиноподобного рецептора всегда происходит вслед за изменением концентрации транскортина. У самок больше транскортина, чем у самцов, соответственно больше у них и транскортиноподобного рецептора. В онтогенезе содержание транскортиноподобного рецептора изменяется, как и содержание транскортина в плазме.

Связывание кортикостерона тканями мозга в онтогенезе имеет тот же характер, что и связывание печенью. Оно крайне незначительно в день рождения, быстро растет в первые дни жизни и окончательно выходит на плато к месячному возрасту. Связывание дексаметазона в онтогенезе развивается несколько иначе. Плато достигается к 15-му дню жизни (Turner, 1978). Эти различия между онтогенезом связывания натурального и синтетического кортикостероидов отражают различия в процессах созревания транскортиноподобного и дексаметазонового рецепторов.

В соответствии с онтогенезом двух типов кортикостероидных рецепторов изменяется с возрастом и величина ядерного связывания гормонов в мозгу и гипофизе (Turner, 1978). У 6-дневных крыс ядерное связывание в гиппокампе и гипофизе почти одинаково — 120 и 90 фмоль/мг ДНК соответственно, так как транскортиноподобные рецепторы еще не сформировались и образующиеся гормон-рецепторные комплексы беспрепятственно транслоцируются в ядро. А у взрослых животных ядерное связывание кортикостерона в гиппокампе во много раз превышает таковое в гипофизе — 300 и 20 фмоль/мг ДНК соответственно. У взрослых крыс ядерное связывание в гиппокампе растет, поскольку увеличивается число транслоцирующихся дексаметазоновых рецепторов, а в гипофизе продолжает расти и число транскортиноподобных, которые, образуя комплексы с кортикостероном, не переносят гормон в ядро и задерживают его в цитоплазме. Следовательно, транскортиноподобные рецепторы могут выполнять в клетке защитные функции, они способны предохранять геном от чрезмерных воздействий при значительном повышении уровня кортикостероидов в окружающей клетку среде. Эта функция транскортиноподобных рецепторов подтверждается экспериментами с перекрестной инкубацией ядер клеток гипофиза самцов и самок крыс (Koch et al., 1981). Как известно, у самок в цитоплазме содержание транскортиноподобного рецептора в 2—3 раза больше, чем у самцов. Вследствие этого у них связывание кортикостерона в ядрах клеток примерно в три раза меньше, чем у самцов. Если же инкубировать с кортикостероном отмытые ядра клеток, взятых из гипофиза самок в присутствии цитозоля, полученного из гипофиза самцов, то связывание кортикостерона в ядрах возрастает по сравнению с контролем. При обратной комбинации, если ядра самцов инкубируются с цитозолем самок, ядерное связывание уменьшается по сравнению с целыми клетками самцов. Таким образом, транскортиноподобные рецепторы предохраняют геном клеток-мишеней, в первую очередь гипофиза, от значительных повышений концентрации кортикостероидов.

Кроме защитной функции, транскортиноподобные рецепторы могут осуществлять и транспортную функцию. В клетки гипофиза кортикостерон проникает значительно быстрее, чем дексаметазон (Koch et al., 1981). При изучении рецепции кортикостерона в печени обнаружено, что связывание кортикостерона с транскортиноподобными рецепторами протекает во времени по степенному закону, а связывание с дексаметазоновыми — по линейному (Beato et al., 1969). Транскортиноподобные рецепторы обнаружены в мембране клеток гипофиза (Szego, Pietras, 1981). Возможно, что они осуществляют функцию транспорта гормона в клетку, а этот процесс зависит от полярности молекулы гормона — чем больше полярность, тем меньше скорость проникновения. Такая теория также объясняет большую скорость проникновения в клетку кортикостерона, чем дексаметазона.

Третья функция транскортиноподобных рецепторов состоит в том, что они сами могут опосредовать некоторые эффекты гормонов. Хотя общепринятой в настоящее время является теория, предполагающая непременно вовлечение генома при реализации различных гормональных влияний (Кырге, 1981; Розен, 1984), однако существует ряд косвенных указаний на такую возможность. При электрической аппликации кортикостероидов в разные структуры мозга узор ответа нейрона изменяется с латентным периодом в несколько секунд (Филаретов, 1979; Szego, Pietras, 1981), тогда как эффекты кортикостероидов, опосредуемые через геном, регистрируются самое малое через несколько минут после введения гормона в среду (Розен, Смирнов, 1981). Кроме того, транскортиноподобный рецептор находится во всех тканях в сочетании с дексаметазоновым рецептором, однако недавно в верхнем шейном ганглии обнаружен только один транскортиноподобный рецептор (Towle et al., 1982). Очевидно, что защитная функция в этом случае не может иметь место, следовательно транскортиноподобный рецептор должен иметь какое-то иное значение. Таким образом, вполне вероятно, что, взаимодействуя с транскортиноподобным рецептором, кортикостероиды могут изменять, скажем, свойства мембраны нейрона, что в свою очередь может вести к изменениям спайковой активности клетки или же к изменениям в процессах формирования и выделения секреторных молекул.

Содержание кортикостероидных рецепторов в головном мозгу и гипофизе, как и в других тканях, изменяется под влиянием различных факторов. Адреналэктомия приводит к увеличению связывания кортикостероидов. Некоторыми авторами указывается, что после адреналэктомии увеличивается только связывание кортикостерона, а связывание дексаметазона остается неизменным (Izawa et al., 1982), однако большинство авторов указывает на то, что содержание транскортиноподобного и дексаметазонового рецепторов после адреналэктомии растет. При этом отмечается различный характер увеличения числа рецепторов в разных структурах (Angelucci et al., 1980).

Уровень рецепторного связывания кортикостероидов в нервной ткани и гипофизе регулируется не только по уровню гормонов в крови. При разрушении различных ядер перегородки наряду с изменением поведенческих реакций и электрической активности гиппокампа отмечаются изменения связывания кортикостерона в гиппокампальных клетках при неизменном содержании кортикостерона в плазме. Максимальный подъем рецепторного связывания кортикостерона отмечается при разрушении задне-латерального ядра перегородки — места локализации кортикостероидных рецепторов в этой структуре. Другая группа исследователей отмечала увеличение связывания кортикостерона в гиппокампе при перерезке фимбрии (Белый, 1980). После введения каиновой кислоты, которая частично разрушает пирамидные клетки в полях CA₁ и CA₂ и гранулярные нейроны зубчатой фасции, наблюдалось увеличение рецепторного связывания кортикостерона в оставшихся клетках. При этом животные с поврежденным гиппокампом проявляли повышенную чувствительность к кортикостерону. Унилатеральное разрушение гиппокампа приводит к увеличению рецепторного связывания кортикостерона в контралатеральном гиппокампе (Nyakas et al., 1983). Разрушение других структур не вызывало изменения в величине рецепторного связывания в гиппокампе контралатерального полушария. Все эти данные свидетельствуют о том, что в мозгу имеются компенсаторные механизмы, поддерживающие на постоянном уровне суммарный рецепторный пул данной структуры, необходимый для осуществления неких функций. Остается неизвестным, насколько такой механизм специфичен для гиппокампа, будут ли другие структуры реагировать аналогично. Реакции гиппокампа при разных воздействиях на организм отличаются от реакций других структур.

Введение резерпина приводит к аналогичному снижению связывания дексаметазона в гипоталамусе у кошек. Константа диссоциации гормон-рецепторного комплекса при этом не меняется. В то же время в гиппокампе достоверных отличий между опытными и контрольными животными не обнаруживается. Введение 6-гидроксидофамина в III желудочек адреналэктомизированным собакам вызывает снижение рецепторного связывания дексаметазона в гипоталамусе. Константа диссоциации гормон-рецепторного комплекса у экспериментальных животных почти не изменяется. В то же время в гиппокампе изменений в числе рецепторов не обнаружено. Уровень рецепторного связывания кортикостероидов может повышаться, например в гипоталамусе собак, после электрической стимуляции миндалина и гиппокампа (Stith, Person, 1982).

Воздействия на моноаминергическую систему мозга могут приводить к изменениям рецепторного связывания кортикостероидов и в гиппокампе. Введение 5,7-дигидрокситриптамина не подавляет суточную ритмику кортикостероидов в организме, но подавляет суточный ритм рецепторов кортикостерона в гиппо-

кампе (Angelucci et al., 1980). В том же исследовании было установлено, что введение хлорпромазина снижает, а галоперидол — повышает рецепторное связывание кортикостерона в гиппокампе крыс.

Рецепторное связывание кортикостероидов в гиппокампе и перегородке изменяется в зависимости от места особи в иерархии плотности заселения колонии, содержания животных в одиночестве или в группе (Angelucci et al., 1980). Кроме социальных факторов, на величину рецепции оказывает влияние и стрессорное воздействие. Общее поглощение мозгом кортикостероидных гормонов из крови возрастает после эфирного стресса. Прямое определение радиоиммунологическим методом содержания кортикостерона в ядрах клеток показало значительное увеличение его во всех структурах мозга, в том числе гиппокампе, гипоталамусе, миндалях и в гипофизе (McEwen et al., 1980). Эти результаты, по всей вероятности, свидетельствуют об увеличении числа ядерных рецепторов после стресса. Число цитозольных рецепторов кортикостероидов при стрессе, вызванном перенаселением колонии, снижается в гиппокампе и перегородке (Angelucci et al., 1980). Кроме того, стресс предупреждает подъем содержания рецепторов в этих структурах, вызванный адреналэктомией.

Таким образом, рецепторы кортикостероидных гормонов в нервной ткани связаны, по всей вероятности, с реализацией многочисленных и разнообразных функций организма.

О РОЛИ РЕЦЕПТОРОВ В ДЕЙСТВИИ КОРТИКОСТЕРОИДОВ ПО МЕХАНИЗМУ ОБРАТНОЙ СВЯЗИ

В литературе накоплено большое количество сведений о том, что кортикостероидные гормоны по механизму обратной связи угнетают функцию гипофиз-адреналовой системы (см. обзоры: Agarwal, 1977; Baxter, Rousseau, 1979). Основное место в этом действии отводится гипофизу и гипоталамусу, которые могут быть отнесены к числу гормонзависимых образований. При имплантации кортикостероидов в эти структуры отмечается как снижение базальной секреции кортикостероидов, так и ослабление ответа на стрессорное воздействие. Системное введение кортикостероидов подавляет нейрональную активность гипоталамуса, препятствует освобождению кортиколиберина и снижает его содержание в срединном возвышении. Отмечается снижение секреции кортиколиберина и АКТГ в условиях *in vitro*, при инкубации клеток гипоталамуса и гипофиза с кортикостероидами. Все эти факты свидетельствуют о том, что как гипофиз, так и гипоталамус могут считаться местом приложения отрицательной обратной связи в процессе регуляции гипофиз-адреналовой системы кортикостероидными гормонами.

Менее ясным до сих пор остается вопрос о вовлеченности лимбических структур и других экстрагипоталамических отделов мозга в действие кортикостероидов по механизму обратной связи.

Есть мнение о том, что гормоны адrenaловых желез уменьшают поток афферентной импульсации в гипоталамус и что это уменьшение связано с изменением синтеза и секреции медиаторов, осуществляющих передачу сигналов к кортиколиберинпродуцирующим нейронам (Шаляпина, Ракицкая, 1979). Выяснение всех этих вопросов принципиально важно, так как открывает пути в поиске эффективных способов ликвидации тех неизбежных последствий, которые присущи всем видам гормональной терапии.

Как уже говорилось, в основе взаимодействия кортикостероидов с клетками гормонзависимых образований лежит их рецепторное связывание. Это связывание, с точки зрения физиолога, является прямым следствием и показателем приверженности и взаимодействия этих гормонов со структурами, участие которых в регуляции той или иной функции уже доказано. Путем корреляции этой функции с рецепторным связыванием можно в определенной мере судить и о доле участия отдельных структур, что, несмотря на кажущуюся логичность и простоту, до сих пор является неясным. Кроме того, можно, исходя из самой функции, подлежащей соответствующему анализу, говорить о роли тех образований, значение которых в регуляции либо еще не установлено, либо не до конца расшифровано. В связи с этим мы изучали влияние кортикостероидов на их синтез и секрецию в зависимости от рецепции данных гормонов в гипофизе, гипоталамусе, а также в гиппокампе и ряде моноаминергических структур. Вводя крысам гидрокортизон (Гедеон—Рихтер) в дозах 2.5, 5.0 и 10.0 мг/кг массы тела, мы установили, что сила блокирующего эффекта и его длительность дозозависимы от рецепции кортикостероидов в гипофизе (рис. 1) и что по мере ликвидации блокады гипофиз-адrenaловой системы восстанавливается и рецепторное связывание гормонов в этом образовании.

Аналогичное заключение было сделано и в работах других авторов. Так, при инфузии гормонов крысам было, в частности, найдено, что концентрация АКТГ в гипофизе уменьшалась пропорционально дозе кортикостерона и что выраженность этого уменьшения зависела от скорости инфузии (Rotszteijn et al., 1975). В условиях *in vitro* при инкубации клеток гипофиза в среде, содержащей кортикостероиды, была установлена зависимость выделения в среду АКТГ от числа свободных глюкокортикоидных рецепторов в гипофизарной культуре. По мере увеличения концентрации гормона снижалось содержание АКТГ, а также число рецепторов (Koch et al., 1981). Гипофиз, как уже указывалось, имеет не только транслоцирующиеся, но и большое число транскортинподобных рецепторов (Alexis et al., 1983), что, по всей видимости, лежит в основе различного влияния натуральных и синтетических гормонов на гипофиз-адrenaловую систему. У крыс гидрокортизон в 5 раз эффективнее, чем кортикостерон, а дексаметазон в 40 раз больше, чем гидрокортизон, тормозит выработку и секрецию кортикостероидов. Исходя из рецепторной природы их воздействия, можно полагать, что тормо-

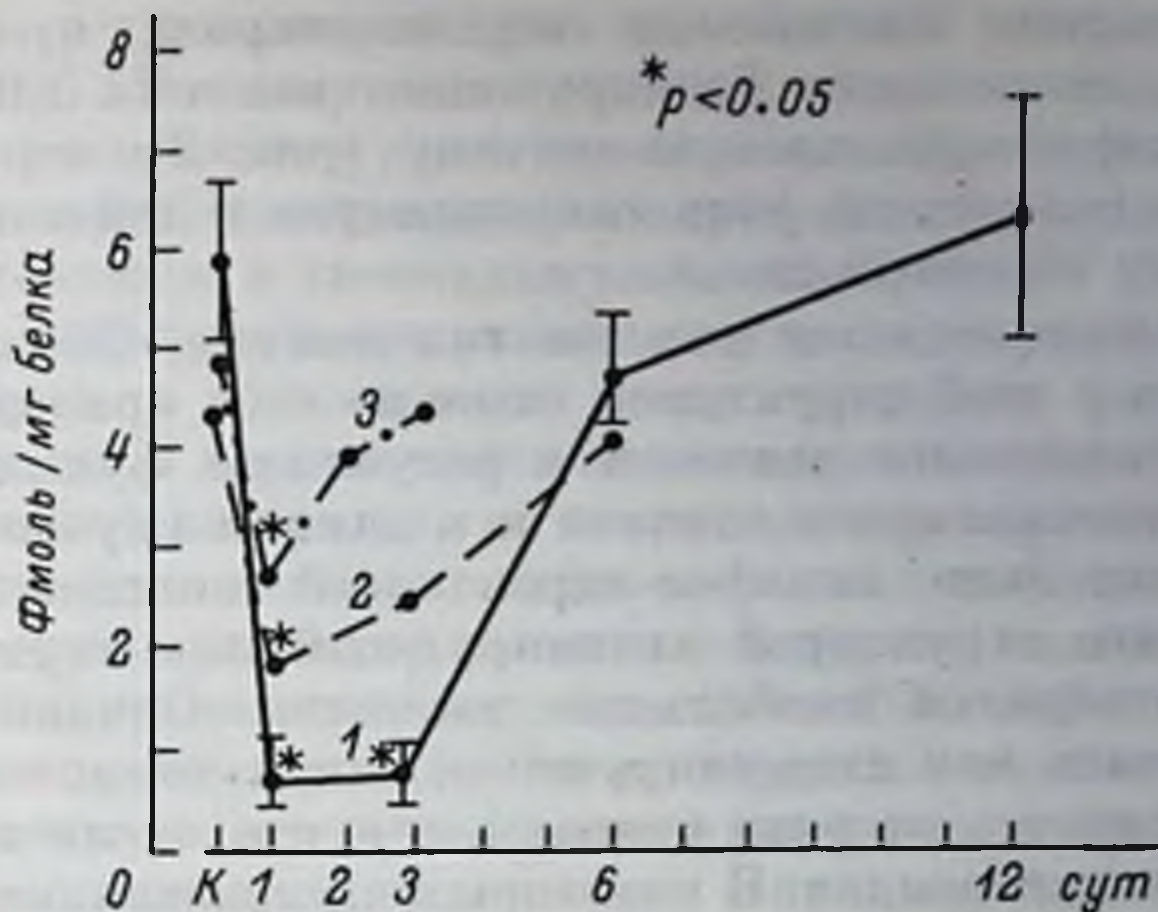


Рис. 1. Изменение рецепторного связывания ^3H -кортикостерона в гипофизе после однократного введения гидрокортизона в разных дозах.

По оси абсцисс — срок после введения гормона, сут; по оси ординат — величина рецепторного связывания, фмоль/мг белка. 1 — гидрокортизон в дозе 50 мг/кг, 2 — 10 мг/кг, 3 — 2.5 мг/кг. К — контроль.

зующее влияние гормона тем больше, чем большая его часть транслоцируется в ядро. Это подтверждается и тем, что введение животным транскортина, предохраняющего кортикостерон от его связывания с ядерными рецепторами, препятствует проявлению его биологического эффекта, и в частности на гипофизадреналовую систему (Acz, Stark, 1975).

О большой роли транскортиновых рецепторов свидетельствует и влияние гормонов по принципу быстрой или отсроченной обратной связи (Jones, Gallham, 1980). Торможение гипофиз-адреналовой системы через несколько минут можно получить только при введении натуральных гормонов — кортикостерона и гидрокортизона, а синтетические гормоны в этом случае менее эффективны. При этом сила тормозного эффекта гормона прямо пропорциональна его сродству с рецептором. Транскортиноподобные рецепторы, по всей видимости, способствуют более быстрому проникновению гормонов в клетки аденогипофиза (Koch et al., 1981). Кроме того, возможно, что эти рецепторы в комплексе с гормоном воздействуют на мембрану клетки, препятствуя секреции АКТГ, однако все эти вопросы имеют пока лишь гипотетическое решение и не доказаны экспериментально.

Важным в механизме действия кортикостероидов на гипофиз-адреналовую систему является гипоталамус. Число рецепторов в нем в расчете на массу ткани и концентрацию белка меньше, чем в гипофизе, по-видимому, потому, что гипоталамус более полиморфная и полифункциональная структура, в которой с секрецией кортикостерона и регуляцией этой секреции связана лишь небольшая часть клеточных элементов. Однако и в данной струк-

туре рецепторное связывание кортикостерона прямо зависит от силы и длительности блокирующего влияния глюкокортикоидов на гипофиз-адреналовую систему (рис. 2), что также подтверждает несомненную роль гипоталамуса в действии гормонов по механизму обратной связи.

Менее ясным остается участие гиппокампа. Обширные связи гипоталамуса с этой структурой сами по себе приводят к мысли о том, что гиппокамп вовлечен в регуляцию функций, контролируемых гипоталамусом, однако и в данном случае не все еще ясно. Относительно гипофиз-адреналовой системы гиппокамп трудно считать структурой активирующей или тормозной, хотя последней отводится наибольшее значение. Однако гиппокамп может вызывать как стимулирующее, так и тормозное влияние, что может зависеть от ряда условий, и в том числе от исходного уровня кортикостероидов. В некоторых исследованиях отмечается двухфазный характер изменений в гипофиз-адреналовой системе при различных воздействиях на гиппокамп (см. обзор: McGowan-Sass, Timiras, 1975).

Существенным основанием интереса к гиппокампу является то, что он представляет собой основную мишень для кортикостероидов в головном мозгу, так как ядерное связывание этих гормонов в гиппокампе значительно превышает таковое в других отделах мозга (McEwen et al., 1980). Кортикостероиды могут изменять импульсную активность нейронов в этой структуре (Dafny et al., 1973; Филаретов, 1979), влиять на поведенческие реакции, взаимодействуя с ним (Angelucci et al., 1980), вызывать многочисленные изменения в нейрохимии гиппокампа (Baxter, Rousseau, 1979). С другой стороны, имеются данные, свидетельствующие о том, что рецепция кортикостероидов в этой структуре не имеет прямого

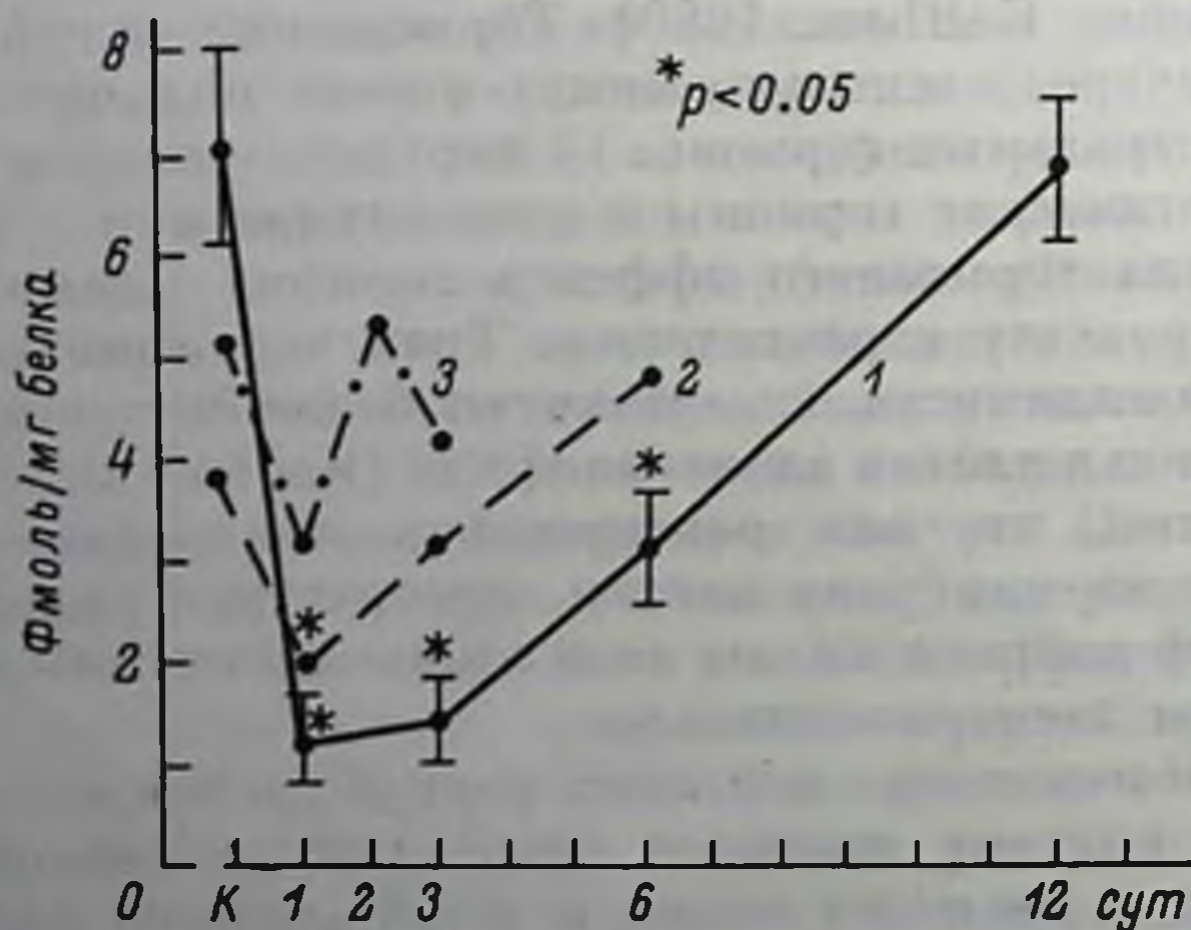


Рис. 2. Изменение рецепторного связывания ^3H -кортикостерона в гипоталамусе после однократного введения гидрокортизона в разных дозах.

Обозначения те же, что и на рис. 1.

отношения к регуляции гипофиз-адреналовой системы (Veldhuis, Kloet de, 1982). Поэтому нам представляется весьма важным изучить характер изменения рецепторного связывания кортикостерона в гиппокампе при блокаде гипофиз-адреналовой системы и сопоставить его с таковым в гипоталамусе и гипофизе.

На рис. 3 представлены изменения рецепторного связывания кортикостерона в гиппокампе после введения различных доз гидрокортизона. В первые сутки после введения гормона рецепторное связывание снижается, но это снижение оказывается достоверным лишь при использовании максимальной дозы 50 мг/кг. На вторые сутки рецепторное связывание несколько возрастает, а еще спустя 3 суток после введения 2.5 и 10.0 мг/кг восстанавливается до исходного уровня. После введения максимальной дозы 50 мг/кг уровень связывания в этот срок резко возрастает, значительно превышая величину рецепции в предыдущий срок. К 6 суткам после введения гидрокортизона в дозе 50 мг/кг рецепторное связывание вновь достоверно понижается, а на 12-е сутки исходный уровень связывания кортикостероидов восстанавливается.

Таким образом, изменения рецепторного связывания кортикостерона в гиппокампе отличается от такового в гипофизе и гипоталамусе, что является еще одним доказательством иной роли гиппокампа в тормозящем воздействии кортикостероидов на гипофиз-адреналовую систему.

Неясным остается до сих пор вопрос о роли коры головного мозга в действии кортикостероидов по механизму обратной связи. Кора головного мозга регулирует многие вегетативные функции. В большинстве случаев такой контроль не является прямым и опосредуется через различные подкорковые образования. Поэтому можно предполагать, что влияние гиппокампа на активность гипофиз-адреналовой системы модулируется корой головного мозга. Кроме того, известны олигосинаптические связи гипоталамуса с корой (Halasz, 1981), а биохимическими и автордиографическими методиками показано наличие специфических кортикостероидных рецепторов в коре головного мозга (Baxter, Rousseau, 1979; Stumpf, Sar, 1979; Angelucci et al., 1980). Что касается эффекта кортикостероидов на рецепцию в коре головного мозга, то таких сведений, кроме наших работ, в литературе до сих пор не имеется. На рис. 4 представлены результаты выполненных нами исследований, в которых показано, что после введения гидрокортизона в дозе 50 мг/кг уровень рецепции кортикостерона в первые сутки снижается, затем на 3-е сутки повышается, выходя за пределы исходных величин, а далее к 6-м и 12-м суткам нормализуется.

Подводя итог вышесказанному, можно заключить, что при блокаде гипофиз-адреналовой системы, вызванной введением гидрокортизона, происходит снижение рецепторного связывания кортикостероидов в органах-мишенях. На первоначальном этапе блокады это снижение имеет дозозависимый характер, т. е. степень снижения коррелирует с глубиной блокады гипофиз-адреналовой

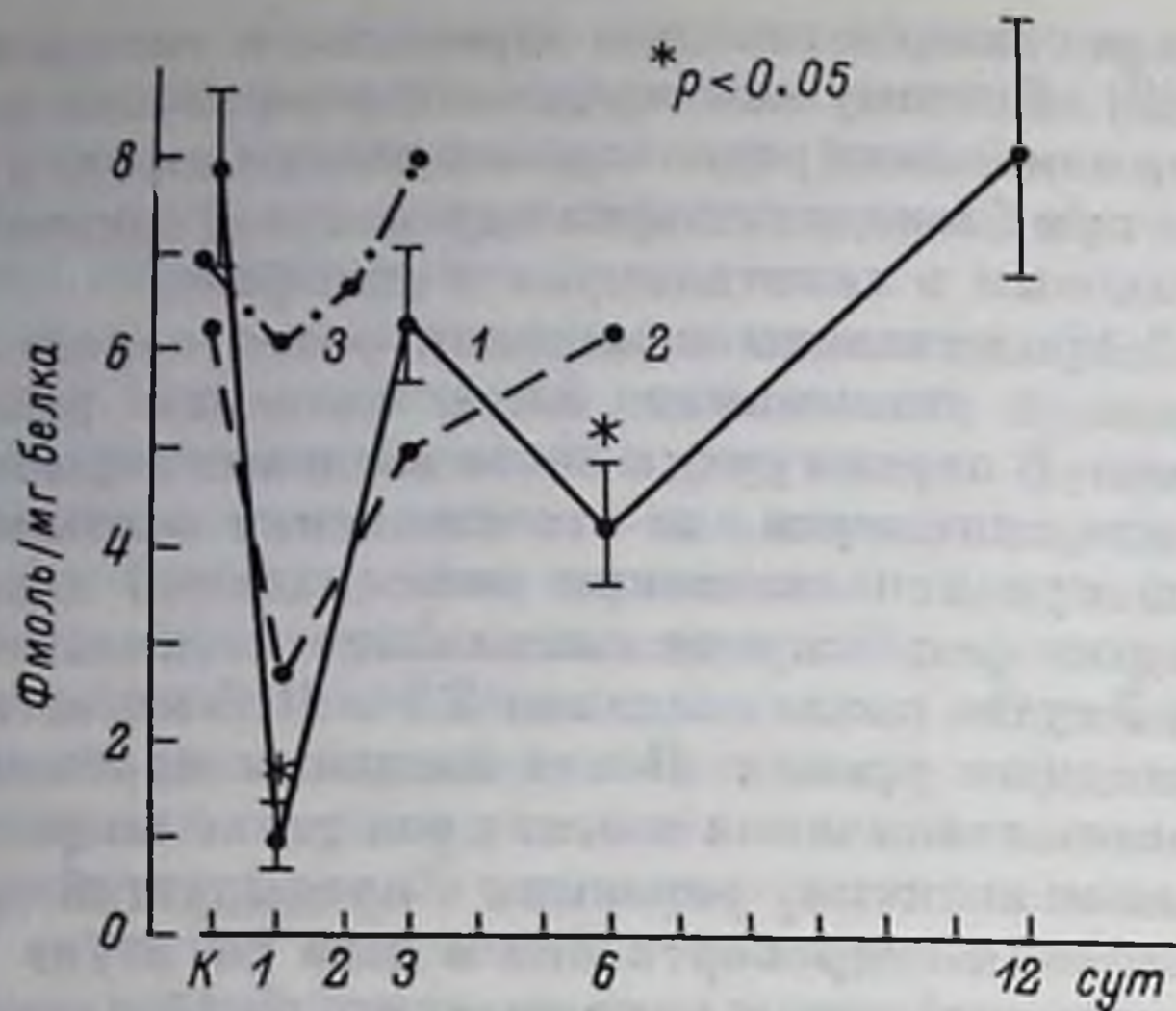


Рис. 3. Изменение рецепторного связывания ^3H -кортикостерона в гиппокампе после однократного введения гидрокортизона в разных дозах.

Обозначения те же, что и на рис. 1.

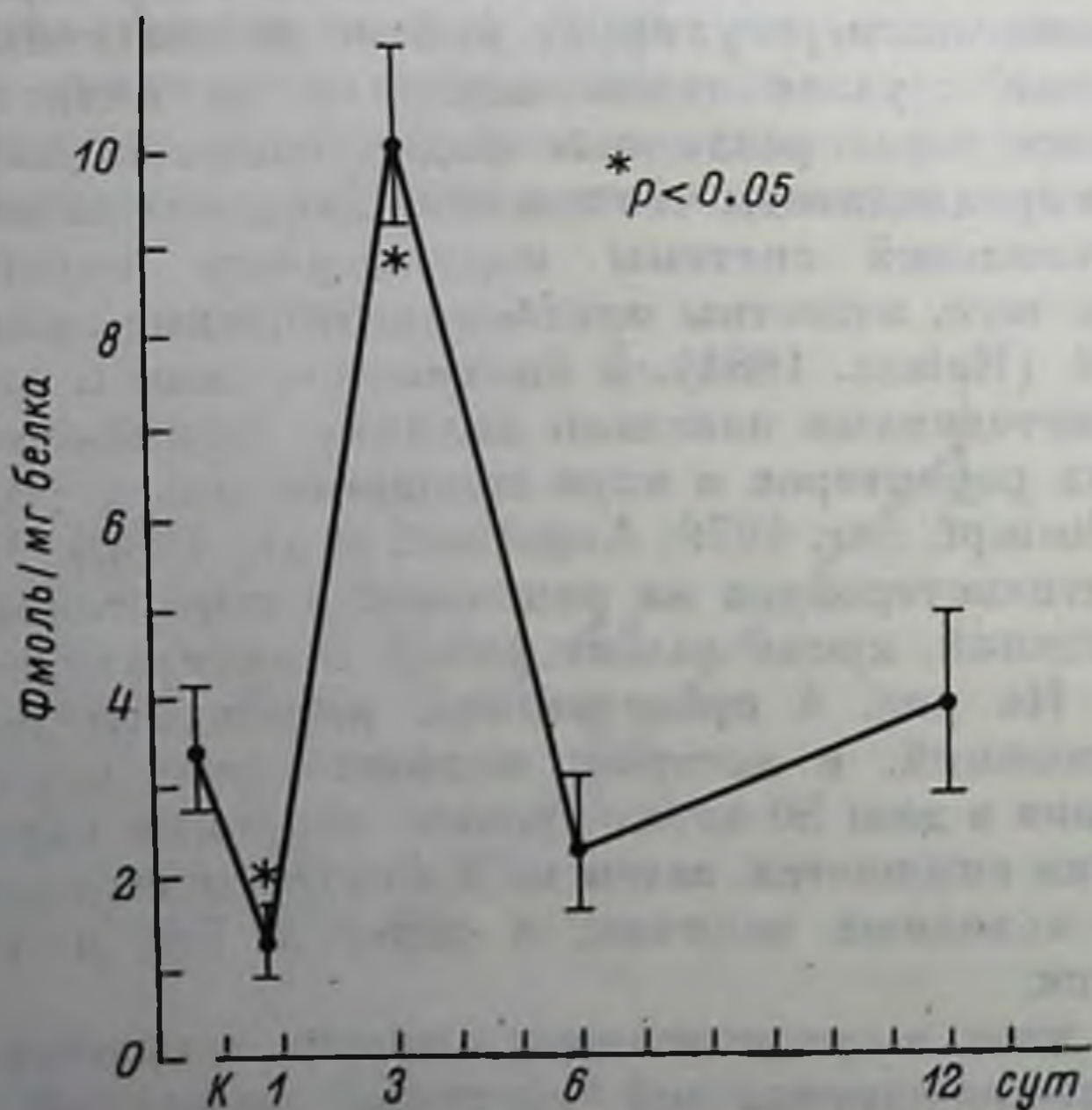


Рис. 4. Изменение рецепторного связывания ^3H -кортикостерона в коре больших полушарий после однократного введения гидрокортизона в дозе 50 мг/кг.

Обозначения те же, что и на рис. 1.

системы. Данные, демонстрирующие эту зависимость (см. таблицу), дают возможность сделать вывод о том, что изменения в коре головного мозга и в гиппокампе носят иной характер и выражены меньше, чем в гипоталамусе и гипофизе, прямо участвующих в регуляции гипофиз-адреналовой системы по механизму обратной связи. Падение уровня рецепции отмечается в гипофизе. Он, как и гипоталамус, реагирует длительным снижением уровня рецепторного связывания кортикостерона. Гипофиз к тому же обладает и наибольшей чувствительностью к введению гормона, т. е. рецепция кортикостерона в нем снижается уже при введении минимальной дозы гидрокортизона, когда в других структурах уровень рецепции еще не изменился. При развитии блокады во времени различия между структурами проявляются еще резче. Только гипофиз и гипоталамус сохраняют сниженный уровень рецепции кортикостерона спустя 3 суток после введения максимальной дозы гидрокортизона. В коре головного мозга рецепция в этот срок увеличивается до значений, достоверно превышающих исходные. Характерно, что в гиппокампе рецепция в дальнейшем снова повышается, тогда как в коре головного мозга она лишь возвращается к исходному значению.

Цитозольная рецепция кортикостерона после введения крысам гидрокортизона (50 мг/кг, внутривенно)

Структура	Контроль	Срок после введения гидрокортизона, сут		
		1	3	12
Гипофиз	5.81±0.80	0.56±0.27 *	0.53±0.28 *	6.37±1.26
Гипоталамус	6.89±0.98	1.11±0.43 *	1.06±0.41 *	6.52±0.72
Гиппокамп	7.75±0.88	0.74±0.32 *	6.21±0.75	8.01±1.42
Кора мозга	3.36±0.74	1.18±0.41 *	10.11±1.01 *	4.12±1.01
Печень	27.09±1.65	16.47±1.53 *	51.02±2.70 *	29.37±2.71

Примечание. Рецепция выражена в фмоль/мг белка; каждая величина представляет среднее значение по опытам на 8 животных; звездочкой отмечены величины, достоверно отличающиеся от контрольных при $p < 0.05$.

Представленные данные свидетельствуют о том, что корреляцию с блокадой гипофиз-адреналовой системы имеет изменение рецепторного связывания кортикостерона лишь в гипофизе и гипоталамусе — структурах, непосредственно относящихся к регуляции этой системы по механизму обратной связи.

Во всех случаях с однократным введением в организм кортикостероидных гормонов корреляция блокады гипофиз-адреналовой системы с рецепторным связыванием гормонов представляется логичным и хорошо показанным явлением, однако же меняющим свой характер в случае длительного введения гормонов. При однократном введении снижение рецепции может быть следствием занятости рецепторов экзогенным гормоном, причем в гипофизе и гипоталамусе этот гормон может задерживаться на рецепторах

дольше, чем в других структурах, что и объясняет их доминирующую роль в действии кортикостероидов на функцию гипофиз-адреналовой системы.

Исходя из необходимости проверить сказанное, мы предприняли изучение рецепции кортикостерона на модели более длительной блокады гипофиз-адреналовой системы многократным введением гидрокортизона. В этом случае, если гормон вводили в течение 2 недель, блокирующий эффект сохранялся на протяжении последующих 2 недель после его отмены, и в этот срок изменения рецепторного связывания в изученных структурах были весьма своеобразными. На следующие сутки после последнего введения гормона уровень специфического связывания кортикостерона в гипофизе и гипоталамусе был достоверно снижен с максимальной выраженностью в гипофизе. Через 1 неделю достоверно сниженный уровень рецепции в гипофизе и гипоталамусе сохранялся, в то время как в гиппокампе спустя неделю после завершения введения гормона уровень рецепции не отличался достоверно от контрольного. Спустя 2 недели после окончания инъекций величина специфического связывания кортикостерона в гипофизе и гипоталамусе остается сниженной, и в это время обнаруживается резкое снижение рецепторного связывания кортикостерона гиппокампом (рис. 5). Возможно, что это связано с изменением функции гиппокампа при выходе гипофиз-адреналовой системы из блокированного состояния.

Тормозящее гипофиз-адреналовую систему влияние гидрокортизона и его взаимосвязь с рецепцией были изучены и на модели неонатального введения гормона. В этом случае гидрокортизон в дозе 0.1 мг вводился в течение первых 5 дней жизни животного, что приводило к угнетению функции гипофиз-адреналовой системы, длящемуся в течение месяца (рис. 6). У этих животных оказывалось сниженным и рецепторное связывание кортикостерона в гипофизе, гипоталамусе и гиппокампе. Нормальный уровень рецепции восстанавливался к трехмесячному возрасту (рис. 7). При вытеснении гидрокортизона дексаметазоном с целью выявления не только транслоцирующихся, но и транскортиноподобных рецепторов в гипофизе было показано, что у животных с неонатально блокированной гипофиз-адреналовой системой связывание кортикостерона последними ниже, чем у контрольных крыс. В гипоталамусе, где, судя по литературным данным (Koch et al., 1981; Alexis et al., 1983), транслоцирующихся рецепторов больше, чем транскортиноподобных, снижение величины специфического связывания у опытных животных выражено в большей мере, чем в гипофизе, где около половины всех рецепторов составляют транскортиноподобные рецепторы. В данной серии опытов обнаружено значительно большее снижение специфического связывания гормонов у животных с блокированной гипофиз-адреналовой системой, чем при определении связывания кортикостерона с рецепторами обоих типов. Следовательно, снижение рецепторного связывания кортикостерона структурами мозга при блокаде ги-

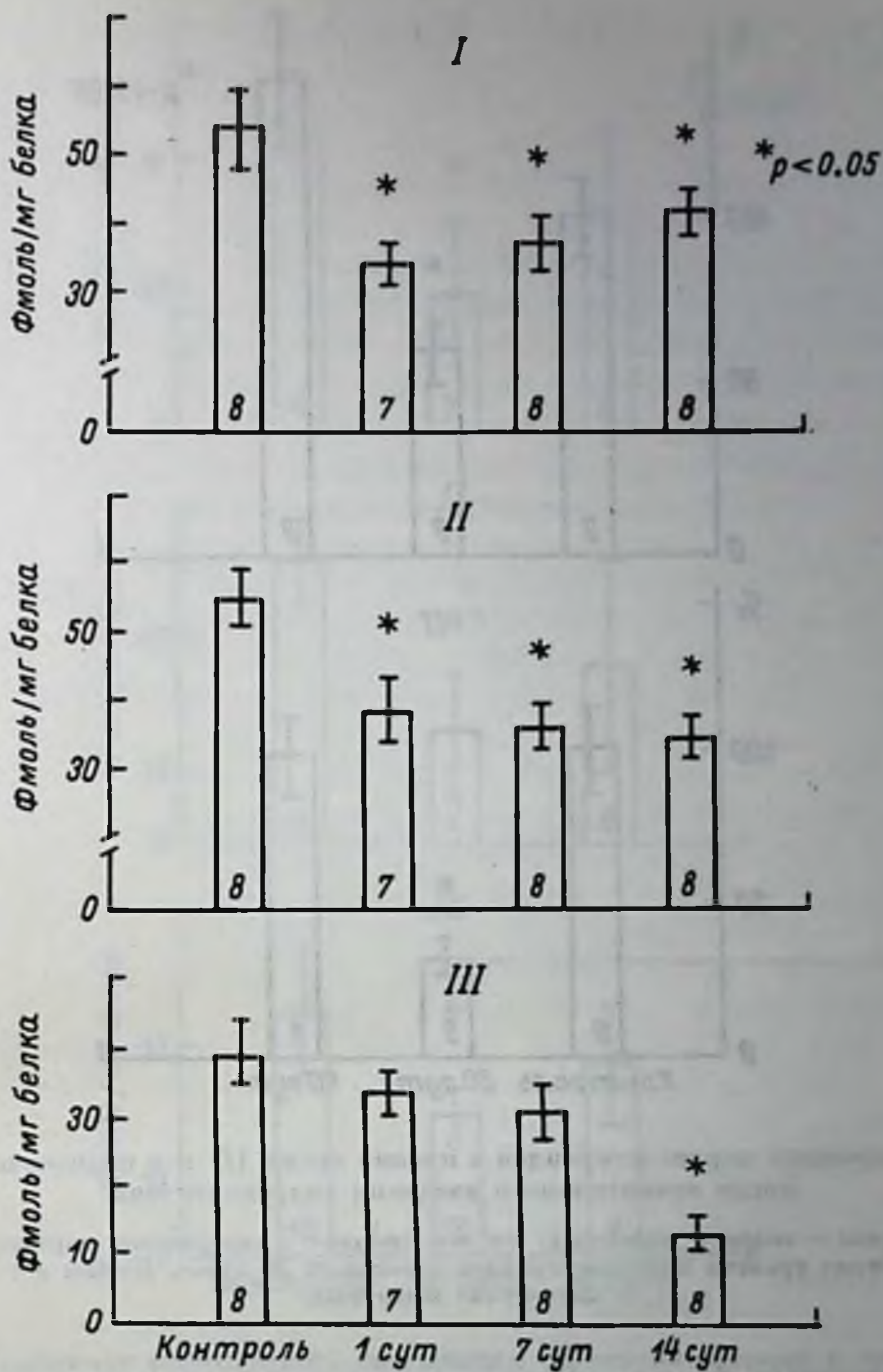


Рис. 5. Изменение рецепторного связывания ^3H -кортикоостерона в гипофизе (I), гипоталамусе (II) и гиппокампе (III) после двухнедельного введения гидрокортизона.

По оси абсцисс — срок после окончания инъекций; по оси ординат — величина рецепторного связывания, фмоль/мг белка. Цифры в столбиках — количество животных.

пофиз-адреналовой системы определяется главным образом, если не исключительно, изменением числа транслоцирующихся рецепторов.

Следует сказать при этом, что снижение связывания гормонов рецепторами при длительном гормональном введении обусловлено не занятостью мест связывания, а уменьшением числа рецепторов, возможно, за счет тормозящего эффекта кортикостероидов на син-

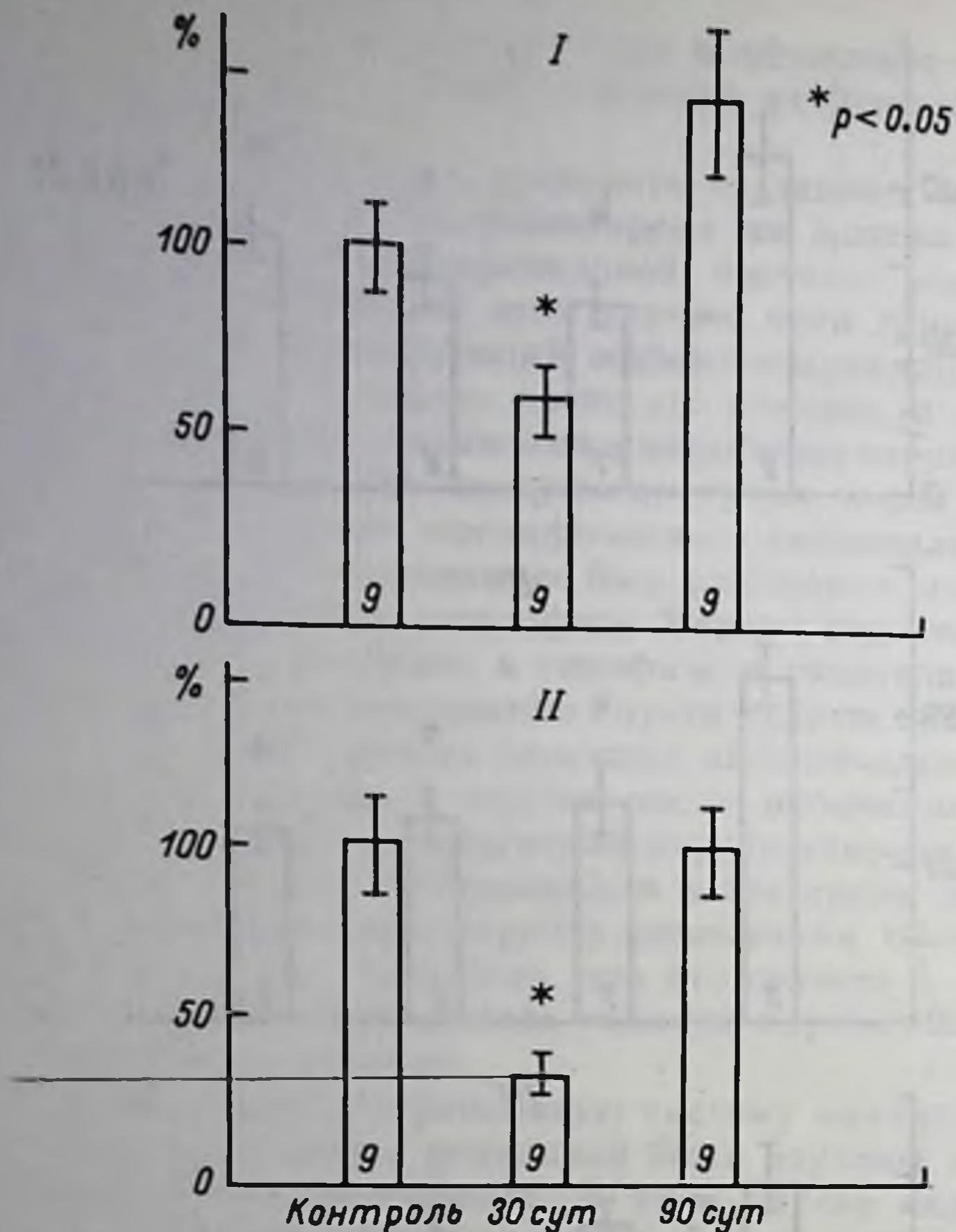


Рис. 6. Содержание кортикостероидов в плазме крови (I) и в надпочечниках (II) после неонатального введения гидрокортизона.

По оси абсцисс — возраст животных; по оси ординат — содержание кортикостероидов. За 100 % принят уровень кортикостероидов в возрасте 30 суток. Цифры в столбиках — количество животных.

тез рецепторных белков. Важно и то, что в случае с введением гормонов в неонатальном онтогенезе снижение числа рецепторов сохраняется дольше, что, исходя из данных литературы о развитии рецепторов в разные возрастные периоды жизни крыс, следует объяснить либо отсутствием в этом возрасте транскортиноподобных рецепторов и транскортина (Тиглер, 1978), либо тем, что гормональные рецепторы в раннем возрасте находятся лишь в начальной фазе своего развития и вследствие этого больше подвержены гормональным воздействиям.

Одним из вопросов, интересующих физиологов в настоящее время, является регуляция гипофиз-адреналовой системы по принципу быстрой или мгновенной обратной связи, вероятно, имеющей основное значение в условиях стрессорного выброса кортикостероидов. Большинство авторов с этих позиций рассматриваются происходящие при стрессе изменения рецепции кортикостероидов,

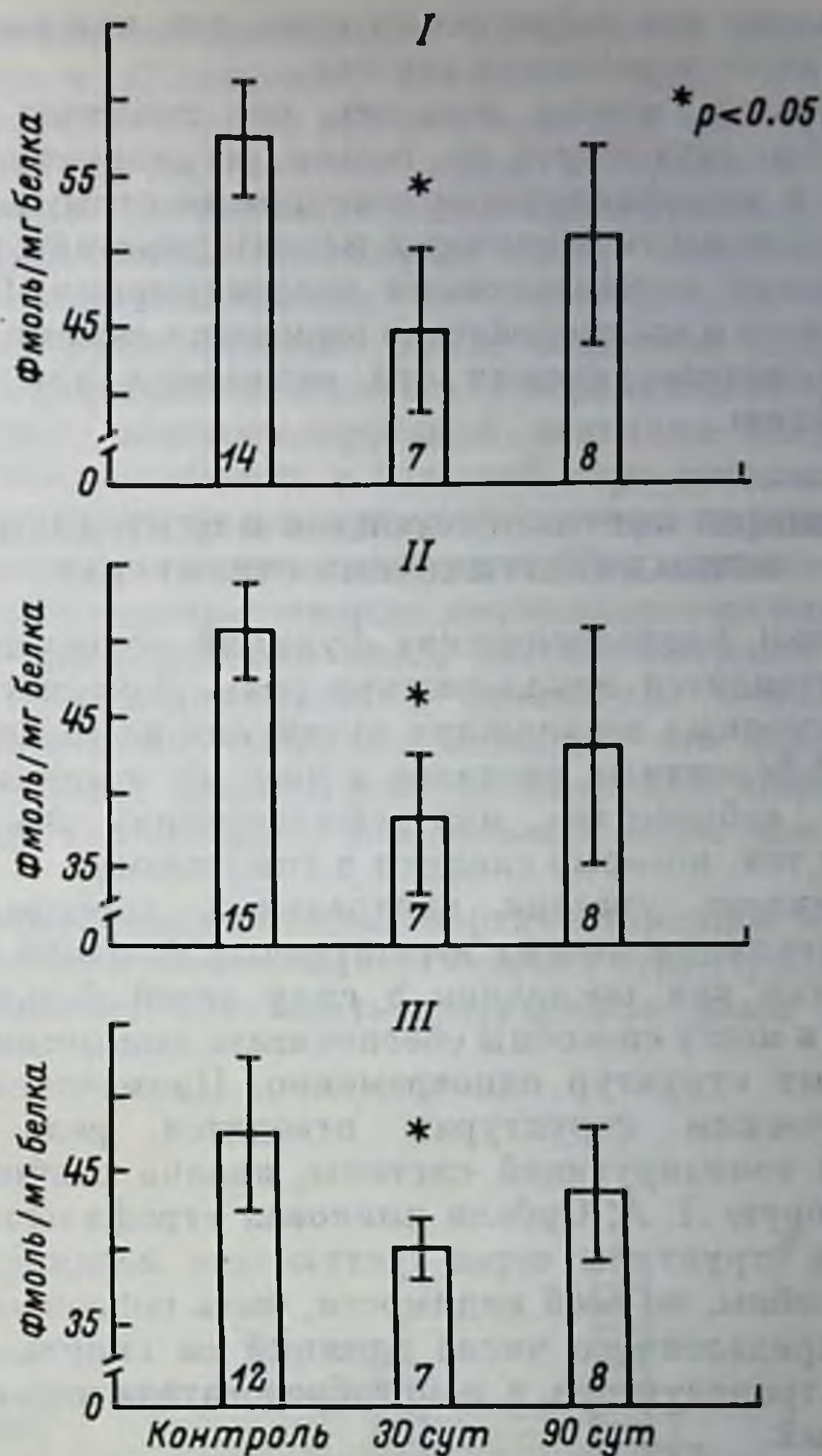


Рис. 7. Изменение рецепторного связывания ³H-кортикостерона в гипофизе (I), гипоталамусе (II) и гиппокампе (III) после неонатального введения гидрокортизона.

По оси абсцисс — возраст животных; по оси ординат — величина рецепторного связывания, фмоль/мг белка. Цифры в столбиках — количество животных.

обусловленные влиянием на регуляторные структуры эндогенных гормонов (Голиков и др., 1983). Однако этому противоречат наши исследования, которые были выполнены на крысах с удаленными надпочечниками. У них стрессорное воздействие не могло вызвать секрецию собственных кортикостероидов, однако при 3-часовой иммобилизации рецепция кортикостерона уменьшалась не только в гипофизе, но и в гиппокампе и в коре головного мозга. Некоторое увеличение рецепторного связывания было обнаружено лишь в гипоталамусе, что, по всей видимости, должно

отражать влияние тех нейрогенных стимулов, которым эта структура подвергается в условиях стресса.

Таким образом, можно полагать, что рецепция кортикостероидов и число рецепторов не только регулируется по уровню гормонов, но и модифицируется сенсорными стимулами, модулирующими деятельность рецепторов медиаторами или любыми другими вторичными межклеточными мессенджерами. В этой связи важным является и взаимодействие гормонов с самими клеточными элементами, синтезирующими эти медиаторы или влияющими на их продукцию.

РЕЦЕПЦИЯ КОРТИКОСТЕРОИДОВ В ЦЕНТРАЛЬНЫХ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКИХ СТРУКТУРАХ

В регуляции физиологических функций моноаминергическим структурам отводится немаловажная роль. Локализуясь по ходу следования основных восходящих путей, они не только участвуют в передаче афферентных сигналов в мозг, но и каким-то образом способствуют «обработке» или «фильтрации» этих сигналов, и в том числе тех, которые следуют в гипоталамус. К настоящему времени выявлено участие центральных норадренергических структур в регуляции многих вегетативных функций мозга, и это неслучайно, так как последние в силу своей большой распространенности в мозгу способны обеспечивать взаимосвязь большого числа мозговых структур одновременно. Примечательно то, что норадренергическим структурам отводится роль «энергизирующей» или тонизирующей системы, вполне равнозначной той функции, которую Л. А. Орбели именовал «трофической». Норадренергические структуры через густую сеть норадренергических нейронов способны, по всей видимости, быть конечными звеньями в передаче определенного числа влияний на гипоталамус, играя при этом роль трансдуктора, т. е. преобразователя нервного сигнала в гормональный.

Многие факты свидетельствуют о том, что аналогичное значение могут выполнять и дофаминергические структуры, и особенно система мезокортикальных дофаминергических нейронов. Роль нигростриальных нейронов трактуется несколько иначе в связи с их участием в локомоторной деятельности — именно она больше всего нуждается в энергообеспечении и, следовательно, подвержена гормональным влияниям. Естественным с этих позиций является интерес исследователей к действию гормонов на моноаминергические структуры, столь важные в жизнедеятельности организма. Что касается кортикостероидных гормонов, то их влияние на моноаминергические структуры уже было показано при изучении как уровня, так и обмена медиаторов в мозгу (Шаляпина, Ракицкая, 1979). Выраженные и сложные по своему характеру эффекты кортикостероидов подразумевают и сложность в механизме их действия — и здесь бесспорный интерес приобретают трансрецепторные пути реализации этих эффектов.

На основании избирательного поглощения кортикостероидов голубым пятном (Красуская, Ракицкая, 1982) мы причислили данное образование к числу органов-мишеней для кортикостероидных гормонов. В дальнейшем наше предположение получило подтверждение и при изучении рецепторного связывания кортикостероидов. Как оказалось, голубое пятно способно с помощью рецепторов связывать больше кортикостероидов, чем соседние с ним участки продолговатого мозга, лишенные нейронов, синтезирующих норадреналин. Важным и отражающим функциональную значимость кортикостероидной рецепции голубым пятном является и его способность в большей мере связывать натуральные (кортикостерон, гидрокортизон), а не синтетические (дексаметазон) кортикостероидные гормоны. Еще активнее, как оказалось, связывают кортикостероиды дофаминергические нейроны, из которых мы анализировали лишь nigro-стриарные образования. В отличие от существующих в литературе немногочисленных данных (Towle et al., 1982) мы показали, что полосатое тело и черная субстанция захватывают рецепторами кортикостероиды почти так же, как гипофиз, и в большей мере, чем гипоталамус (рис. 8).

Что касается влияния самих кортикостероидов на кортикостероидную рецепцию в моноаминергических структурах, то в данном случае однозначно трактовать полученные нами данные пока

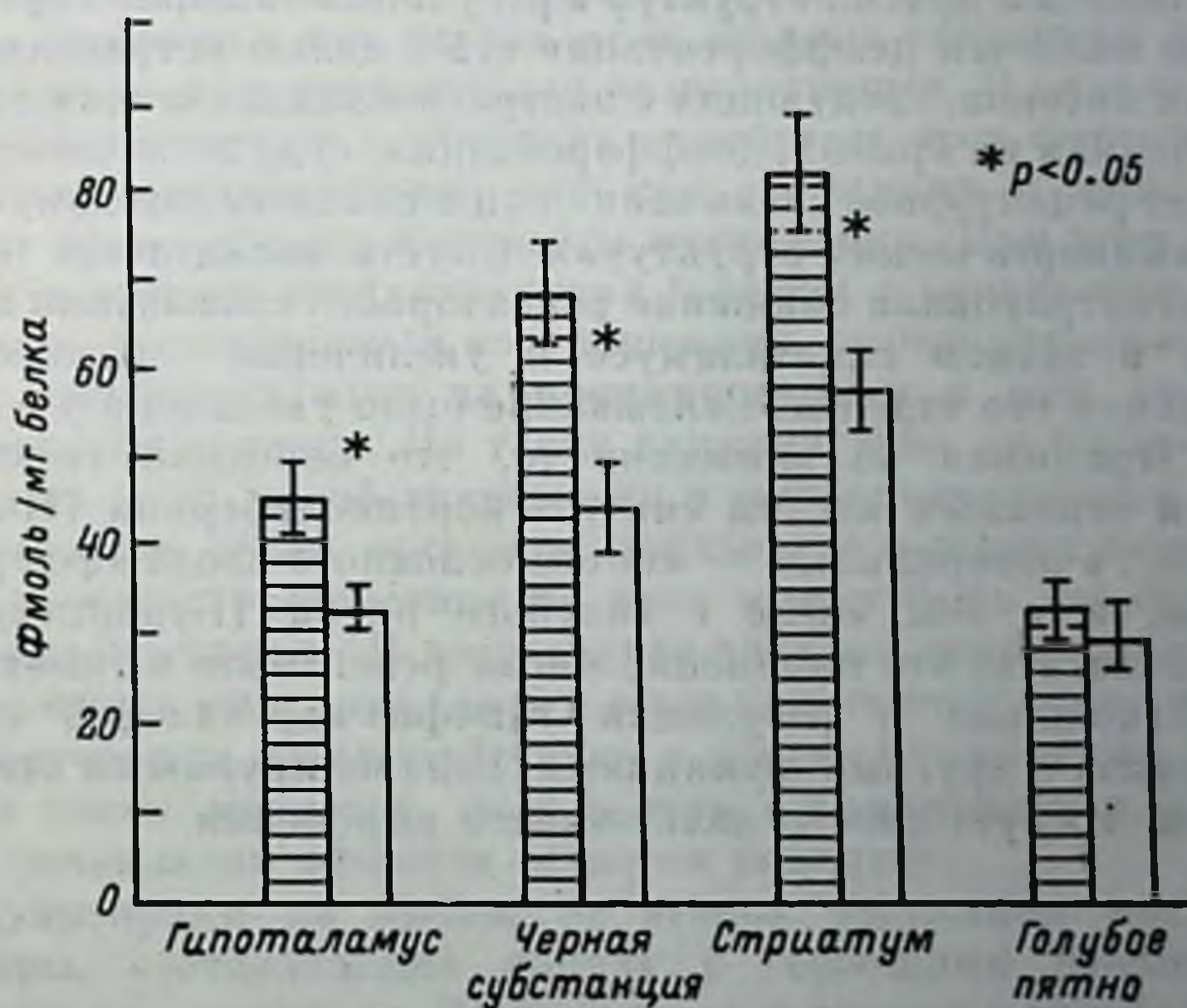


Рис. 8. Рецепторное связывание ^3H -кортикостерона у месячных животных в катехоламинергических структурах после неонатального введения гидрокортизона.

По оси ординат — величина рецепторного связывания, фмоль/мг белка. Заштрихованные столбики — контроль, светлые — опыт.

невозможно. При введении гидрокортизона крысам в дозе 50 мг/кг массы тела не было найдено сколько-нибудь существенного влияния на рецепцию кортикостероидов в голубом пятне. В то же время в черной субстанции и полосатом теле можно было отметить уменьшение рецепторного связывания кортикостероидов, но наступало оно позже, чем в гипофизе и гипоталамусе. Более глубокие изменения были зарегистрированы при неонатальной блокаде гипофиз-адреналовой системы у крыс, которым гидрокортизон вводили в первые 5 дней жизни животных. Однако и в этом случае рецепторное связывание кортикостерона было уменьшено в доф-аминанергических, но не в норадренергических структурах.

Как и в гипоталамусе, в черной субстанции и полосатом теле через месяц после введения в организм гидрокортизона сохранялось выраженное, почти двукратное, снижение рецепторного связывания кортикостерона. И хотя это прямо коррелировало с блокадой гипофиз-адреналовой системы, мы не склонны соотносить влияние гормонов на рецепцию только к их действию на эту систему, ибо известно, что неонатальное введение кортикостероидов оставляет длительный след как в поведении животных, так и в биохимических показателях ряда мозговых структур (Kosky de et al., 1982). По всей видимости, все эти вопросы требуют более обстоятельного анализа с точки зрения возможных последствий гормональной терапии в раннем возрасте.

Одним из принятых в настоящее время методов изучения роли гипоталамуса и других структур в регуляции гипофиз-адреналовой системы является деафферентация его с целью устранения афферентных потоков, следующих с экстрагипоталамических структур. Выполненная на крысах, деафферентация, судя по нашим данным, изменяет рецепторное связывание как в самом гипоталамусе, так и в моноаминергических структурах. Спустя месяц после операции мы зарегистрировали снижение рецепторного связывания кортикостерона в заднем гипоталамусе и увеличение — в переднем и латеральном его отделах. Связывание было увеличено и в голубом пятне. Принимая во внимание то, что передний гипоталамус является основным местом синтеза кортиколиберина (Поленов и др., 1983), а латеральный — местом основного входа афферентных сигналов, и в том числе с голубого пятна (Буданцев, 1976), можно полагать, что изменение числа рецепторов в гипоталамусе имеет отношение к регуляции гипофиз-адреналовой системы. Взаимосвязь с другими функциями, контролируемыми этим образованием, требует своего дальнейшего выяснения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Влияние кортикостероидных гормонов на организм изучается на протяжении многих лет. С тех пор как Селье выдвинул свою концепцию о стрессе и указал на доминирующую роль гипофиз-адреналовой системы в реализации ответной реакции организма на внешние стимулы, дискуссия о действии кортикостероидов и их адаптивном значении не затихает. Два основных момента привлекают внимание в этом плане. Первый из них касается многообразия функций, на которые влияют кортикостероиды, а второй — многообразие органов-мишеней для этой группы гормонов. В том и другом случае кортикостероидные гормоны являются почти универсальными регуляторами с весьма выраженными и разнообразными эффектами, приобретающими свое реальное объяснение в соответствии с трансрецепторным механизмом их действия.

Как и для любого другого гормона, для кортикостероидов рецептор является прибором, узнающим и реализующим гормональный сигнал, что зависит, однако, от многих факторов и обстоятельств. Одним из таких факторов является транспортировка гормона по цепи кровь-транскортин-цитозоль-ядро клетки. На любом из этих звеньев взаимодействие гормона может быть изменено или модифицировано, а может и вовсе прекратиться из-за отсутствия условий в передаче сигнала.

То, что содержание гормонов в крови не определяет гормональные эффекты, стало неоспоримым, но этот фактор тем не менее важен, и особенно в том случае, если система регуляции не сбита еще какими-то дополнительными воздействиями. В случае физиологической регуляции в пределах гомеостаза этот фактор может быть даже наиглавнейшим, так как регуляция в этом случае проходит по хорошо отработанным механизмам. При этом следует ожидать и четкого взаимодействия гормона с рецептором с установленным дозозависимым соотношением, определяющимся лишь числом связующих мест да проникновением к ним свободных гормональных молекул. Но такие влияния вряд ли следует брать в расчет из-за их малой значимости в жизнедеятельности клетки. В большинстве своем организм попадает в различные сложные ситуации, когда воздействие на него может быть сверхсильным или сверхдлительным. В этом случае система компенсации функций становится многозвеневой и в нее вплетаются новые контуры. Кортикостероиды взаимодействуют с другими гормонами, уровень которых также меняется, но и в этом взаимодействии основным местом реализации эффекта остается рецептор.

Модуляторами на любом из этапов регуляции могут быть медиаторы, составляющие наряду с гормонами важное звено в гуморальном контроле. В отличие от гормонов медиаторы выделяются в межнейрональное пространство или в синаптические щели и взаимодействуют с гормонами либо через межклеточную жидкость, либо на мембранах клеток. В этом случае цепь взаимодействия становится более короткой и по своей значимости может

быть более локальной. Все эти взаимодействия становятся особенно важными в условиях длительного изменения регуляции функций. В этом случае вследствие длительного воздействия на рецепторы нейрогенных сигналов или измененных уровней гормонов и медиаторов сами рецепторные приборы могут изменить свои свойства и на длительный срок стать тем звеном, которое определяет патологические проявления в регуляторной цепи. Именно с этих позиций мы склонны расценивать уменьшение пула рецепторов при длительной гормональной терапии, уменьшающей рецепторное связывание кортикостероидов вначале из-за занятости мест связи, а в последующем — из-за уменьшения их числа. Неукоснительным при этом остается дозозависимое соотношение, переходящее, однако, из количественного в качественное и из выраженности в длительность, так как большая доза гормона не только в большей мере уменьшает число рецепторов, но и вызывает более длительное последствие.

Важным с точки зрения возможной патологии рецепторов является изменение гормонального уровня в раннем возрасте. Из-за незрелости системы транспорта стероидных гормонов и несовершенства самих рецепторов эффект гормонов может быть более глубоким, на больший срок оставляющий последствия. И хотя к пубертатному возрасту эти последствия, как правило, нивелируются, скрытые дефекты могут сохраняться и в дальнейшем при разрешающих обстоятельствах стать причиной патологических расстройств. В этом случае проблема из физиологической перерастает в патологическую, а далее в клиническую, так как поиск путей борьбы с недугами идет также по линии изменения трансрецепторного взаимодействия. Остается надеяться, что этот поиск ввиду его очевидной значимости будет осуществляться направленно и интенсивно по мере совершенствования методических приемов и расширения наших знаний в данной области науки.

ЛИТЕРАТУРА

- Белый В. П. Влияние микроионофоретических аппликаций кортизола на активность нейронов гиппокампа в опытах на свободнопередвигающихся кроликах. — Физиол. журн. СССР, 1980, т. 66, № 3, с. 325—332.
- Буданцев А. Ю. Моноаминергические системы мозга. М.: Наука, 1976. 287 с.
- Голиков П. П., Николаева Н. Ю., Кириллова Е. Г. Взаимосвязь транскортина и глюкокортикоидных рецепторов типа III с глюкокортикоидными рецепторами типа II при стрессе. — Вопр. мед. химии, 1983, № 4, с. 27—30.
- Комиссаренко В. П., Тронько Н. Д., Минченко А. Г. Современные представления о механизме действия глюкокортикоидных рецепторов. — Физиол. журн. СССР, 1982, т. 28, № 6, с. 721—733.
- Красуская Н. В., Ракицкая В. В. Избирательное поглощение кортикостероидов синим пятном. — В кн.: Структурная и функциональная организация эндокринной системы: Тез. докл. 2-й Всесоюз. конф. по нейроэндокринологии. Иваново, 1982, с. 59.
- Кырге П. К. Молекулярные механизмы действия кортикостероидов. — Усп. физиол. наук, 1981, т. 12, № 1, с. 56—79.

- Митюшов М. И., Богданова Т. С., Гарина И. А. и др. Гипофизарно-адреналовая система и мозг. Л.: Наука, 1976. 235 с.
- Поленов А. Л., Беленький М. А., Данилова О. А. и др. Принципы гипоталамической нейрогормональной регуляции эндокринных функций у млекопитающих. Баку, 1983. 252 с.
- Розен В. Б. Основы эндокринологии. М.: Высшая школа, 1984. 336 с.
- Розен В. Б., Смирнов А. Н. Рецепторы и стероидные гормоны. М.: Изд-во МГУ, 1981. 310 с.
- (Романов А. Г., Кузьменко А. П., Дашкевич В. С. и др.) Romanov A. G., Kuzmenko A. P., Dashkevich V. S. Purified glucocorticoid-receptor complexes from rat liver cytosol preferentially bind in vitro to a homologous DNA fraction whose transcription is activated by cortisol. — FEBS Lett., 1984, vol. 165, p. 35—38.
- Селезнев Ю. М. Биохимические основы действия глюкокортикоидов на сердце. — Пробл. эндокринолог., 1982, т. 28, № 2, с. 73—79.
- Сергеев П. В. Стероидные гормоны. М.: Наука, 1984. 240 с.
- Филаретов А. А. Нервная регуляция гипофизарно-адренокортикальной системы. Л.: Наука, 1979. 144 с.
- Чемяртан Н. А. Функциональная активность гипофизарно-адренокортикальной системы в разные сроки постнатального онтогенеза у крыс. — Изв. АН МССР, сер. биол. и хим. наук, 1983, № 2, с. 38—42.
- Шалаяпина В. Г., Ракицкая В. В. Адренергические структуры мозга в регуляции гипофизарно-адренокортикальной системы. — В кн.: Катехоламинергические нейроны, М.: Наука, 1979, с. 117—125.
- Acz Z., Stark E. Effect of cortexolone on the feedback action of dexamethasone. — *Experientia*, 1975, vol. 31, p. 767—772.
- Agarwal M. K. Comparative studies on heterogeneity of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors. — In: Multiple molecular forms of steroid hormone receptors. Amsterdam: Elsevier, 1977, p. 93—112.
- Alexis M. N., Stylianopoulou F., Kitraki E., Sekeris C. The distribution and properties of the glucocorticoid receptor from the rat brain and pituitary. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, N 8, p. 4710—4714.
- Angelucci L., Valeri P., Palmery M. et al. Brain glucocorticoid receptors: correlation of in vivo uptake of corticoid with behavioral, endocrine and neuropharmacological events. — In: Receptors for neurotransmitters and peptide hormone. N. Y.: Raven Press, 1980, p. 391—406.
- Baxter J. D., Rousseau G. G. Glucocorticoid hormone action. Berlin: Springer-Verlag, 1979. 638 p.
- Beato M., Biesewing D., Braendle W., Sekeris C. On the mechanism of hormone action. Subcellular distribution and binding of (1,2-³H)-cortisol in rat liver. — *Biochim. et biophys. acta*, 1969, vol. 192, N 3, p. 494—507.
- Bell P. A., Munck A. Steroid-binding properties and stabilisation of cytoplasmic glucocorticoid receptors from rat thymus cells. — *Biochem. J.*, 1973, vol. 136, p. 97—107.
- Cidlowski J. A., Cidlowski N. B. Regulation of glucocorticoid receptors by glucocorticoids in cultured HeLa_{S3} cells. — *Endocrinology*, 1981, vol. 109, p. 1975—1982.
- Dafny N., Phyllips M., Taylor A. Dose effects of cortisol on single units activity in hypothalamus, reticular formation and hippocampus of freely behaving rats correlated with plasma steroid levels. — *Brain Res.*, 1973, vol. 59, p. 257—272.
- Giannopoulos G. Ontogeny of glucocorticoid receptors in rat liver. — *J. Biol. Chem.*, 1975, vol. 250, p. 5847—5851.
- Granberg J. P., Ballard P. L. The role of sulfhydryl groups in the binding of glucocorticoids by cytoplasmic receptors of lung and other mammalian tissues. — *Endocrinology*, 1977, vol. 100, p. 1160—1168.
- Grote H., Schmid W., Sekeris C. Binding of (³H)-dexamethasone to rat liver cytosol proteins during postnatal development. — *FEBS Lett.*, 1977, vol. 82, p. 329—332.
- Holasz B. Organization of the nervous structures involved in the control of the anterior pituitary. — *Acta physiol. pol.*, 1981, vol. 32, suppl. 23, p. 3—14.

- Hollander N., Chin Y. In vitro binding of cortisol-1,2-³H by a substance in the supernatant fraction of P1798 mouse lymphosarcoma. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1966, vol. 25, p. 291—297.
- Izawa M., Yoshida A., Ichii S. Dynamics of glucocorticoid receptor and induction of tyrosine aminotransferase in rat liver. — *Endocrinol. Jap.*, 1982, vol. 29, p. 209—218.
- Jones M. T., Gillham B. Corticotropin secretion. — In: *Synthesis and release of adenyhypophyseal hormones*. London: Plenum Press, 1980, p. 587—615.
- Jungblut P., Hughes A., Gaues J. et al. Mechanisms involved in the regulation of steroid receptor levels. — *J. Steroid Biochem.*, 1979, vol. 11, p. 273—278.
- Koch B., Sakly M., Lutz-Bucher B., Briaud B. Glucocorticoid binding and control of ACTH secretion. — *J. Physiol (France)*, 1981, vol. 77, p. 923—933.
- Kontula K. Glucocorticoid receptors and their role in human diseases. — *Ann. Clin. Res.*, 1980, vol. 12, p. 223—235.
- Kosky de S., Nonneman A., Scheff S. Morphologic and behavioral effects of perinatal glucocorticoid administration. — *Physiol. and Behav.*, 1982, vol. 29, p. 895—900.
- Leach K., Grippo J., Housley P. et al. Characteristics of an endogenous glucocorticoid receptor stabilizing factor. — *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, p. 381—588.
- Lindenbaum M., Chatterton R. Interaction of steroids with dexamethazone-binding receptors and corticosteroid-binding globulin in the mammary gland of the mouse in relation to lactation. — *Endocrinology*, 1981, vol. 109, p. 363—375.
- Litwack G., Schmidt T., Markovic R. et al. Activation and DNA binding of the glucocorticoid receptor. — In: *Perspectives in steroid receptor research*. N. Y.: Raven Press, 1980, p. 113—133.
- McEwen B., Stephenson B., Kreg L. Radioimmunoassay of brain tissue and cell nuclear corticosterone. — *J. Neurosci. Meth.*, 1980, vol. 3, p. 57—65.
- McEwen B., Weiss J. M., Schwartz L. Selective retention of corticosterone by limbic structures in rat brain. — *Nature*, 1968, vol. 220, p. 911—912.
- McGowan-Sass B., Timiras P. The hippocampus and hormonal cyclicality. — In: *The hippocampus*. N. Y.: Plenum Press, 1975, vol. 1, p. 355—374.
- Meyer J., Leveille P., Vellis S. de et al. Evidence for glucocorticoid target cells in the rat optic nerve. Hormone binding and glycerophosphate dehydrogenase induction. — *J. Neurochem.*, 1982, vol. 39, p. 432—434.
- Milgrom E. Activation of steroid-receptor complexes. — In: *Biochemical action of hormones*. N. Y.: Academic Press, 1981, vol. 8, p. 465—492.
- Miller L. The mero-receptor. — In: *The biochemical action of hormones*. N. Y.: Academic Press, 1980, vol. 8, p. 233—243.
- Nyakas C., Kloet E. de, Veldhuis H., Bohus B. Hippocampal corticosterone receptors and novelty-induced behavioral activity: effect of kainic acid lesion in the hippocampus. — *Brain Res.*, 1983, vol. 288, p. 219—228.
- Portanova R., Sayers G. Corticosterone suppression of ACTH secretion: actinomycin D sensitive and insensitive components of the response. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1974, vol. 56, p. 928—933.
- Rotsztejn W., Normand M., Lalonde J., Fortier C. Relationship between ACTH release and corticosterone binding by the receptor sites at the adenyhypophysis and dorsal hypothalamus following infusion of corticosterone at a constant rate. — *Endocrinology*, 1975, vol. 97, p. 223—230.
- Rousseau R., Baxter J. D., Tomkins G. M. Glucocorticoid receptors: relationship between steroid binding and biological effects. — *J. Mol. Biol.*, 1972, vol. 67, p. 99—115.
- Schulte H., Chrupsis G., Gold P. et al. Corticotropin releasing factor (CRF) a common line between anterior pituitary and sympathetic responses to stress. — *Acta endocrinol.*, 1983, vol. 102, suppl. 253, p. 32—33.
- Stith R., Person R. Effect of central catecholamine depletion on ³H-dexamethasone binding in the dog. — *Neuroendocrinology*, 1982, vol. 34, p. 410—414.
- Stumpf W., Sar M. Steroid hormone target cells in the extrahypothalamic brain stem and cervical spinal cord: neuroendocrine significance. — In: *Hormonal steroids*. Oxford; London: Pergamon Press, 1979, p. 801—807.
- Szego C., Pietras R. Membrane recognition and effector sites in steroid hormone

- action. — In: *Biochemical action of hormones*. N. Y.: Academic Press, 1981, vol. 8, p. 307—463.
- Thompson E., Lippman N. Mechanism of action of glucocorticoids. — *Metabolism*, 1974, vol. 23, p. 159—202.
- Towle A. C., Sze P. Y., Lauder J. Cytosol glucocorticoid binding in monoaminergic cell groups. — *Dev. Neurosci.*, 1982, vol. 5, p. 458—464.
- Tsukanaka K., Isohashi F., Sakamoto Y. Effect of high level of endogenous corticosterone on glucocorticoid receptors in the spleen of rats bearing AH 130 tumours. — *Gann*, 1981, vol. 72, p. 754—761.
- Turner B. Ontogeny of glucocorticoid binding in rodent brain. — *Amer. Zool.*, 1978, vol. 18, p. 461—475.
- Veldhuis H., Kloet E. de. Significance of ACTH-4-10 in the control of hippocampal corticosterone receptor capacity of hypophysectomized rats. — *Neuroendocrinology*, 1982, vol. 34, p. 374—380.
- Warembourg M. Fixation des steroïdes au niveau du système nerveux central et de l'hypophyse chez différents mammifères. — *Ann. Endocrinol. Fr.*, 1977, vol. 38, p. 41—54.
- Wrange O. A comparison of the glucocorticoid receptor in cytosol from rat liver and hippocampus. — *Biochim. et biophys. acta*, 1979, vol. 82, p. 346—357.

Глава 3

РЕЦЕПТОРЫ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ В ГИПОТАЛАМУСЕ И ИХ ЗНАЧЕНИЕ В РЕГУЛЯЦИИ ЦИКЛИЧЕСКОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЯИЧНИКОВ

Гипоталамус обеспечивает координацию процессов репродукции за счет получения информации как от вышележащих областей центральной нервной системы, так и от периферических половых желез. Для нормального протекания данного процесса необходима целостность гипоталамо-гипофизарно-гонадной системы и наличие определенных взаимосвязей между ее отдельными звеньями. Если информация, поступающая в гипоталамус с других областей нервной системы, передается нейромедиаторами, как адренергического, так и холинергического ряда, то периферические половые гормоны способны осуществить свой эффект путем связывания со специфическими белками-рецепторами (Розен, Смирнов, 1981).

Обнаружение в гипоталамусе белков-рецепторов, способных обеспечивать избирательный захват половых гормонов, инициацию и реализацию специфического гормонального эффекта в клетке, дает возможность исследователям утверждать их причастность к механизму управления репродуктивными процессами в общей системе центральной регуляции гонадотропной функции гипофиза.

СВОЙСТВА И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЦЕПТОРОВ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ В ГИПОТАЛАМУСЕ

Начало исследований по механизму действия стероидных гормонов было положено Йенсенем и Якобсоном (Jensen, Jacobson, 1962), которые впервые выявили места включения меченого эстрадиола в разные органы и ткани. Максимальная интенсивность включения гормона была обнаружена в матке, влагалище, т. е. в органах-мишенях. Впоследствии было найдено (Chowers, McCann, 1965) специфическое накопление эстрогенов в центральной нервной системе, в основном в гипоталамусе, преоптической

области, стволе мозга, коре, а также аденогипофизе. В дальнейшем изучению данного вопроса было посвящено много исследований (Eisenfeld, Axelrod, 1966; Kato, Ville, 1967; Parsons et al., 1981). Нужно отметить, что ^3H -эстрадиол включался в определенные ядра переднего гипоталамуса, аркуатное и вентромедиальные ядра, т. е. в области, ответственные за регуляцию овуляторного выброса лютеинизирующего гормона (ЛГ), и не выявлялся в латеральных ядрах и области заднего гипоталамуса (Stumpf, Sar, 1976; Sheridan, 1979). Эти данные позволили причислить гипоталамус к целевым органам-мишеням половых гормонов. Анализ внутриклеточного распределения эстрадиола показал, что 50—80 % его локализуется в ядре, а 20—35 % — в растворимой фракции клеток — цитозоле (Kato, 1977). Специальные исследования подтвердили, что связывание гормона в гормончувствительных клетках осуществляется за счет макромолекул белковой природы, обратимо связывающих гормон и получивших название «рецептор». Рецепторы обладают специфическими особенностями, присущими только им: 1) их число должно быть ограничено, т. е. связывающие места должны полностью быть насыщены; 2) связывание гормона должно иметь тканевую специфичность, соответствующую его биологической специфичности; 3) связывающие места должны обладать высоким сродством к гормону, а их концентрация должна соответствовать физиологической концентрации гормона; 4) связывание гормона рецептором должно быть обратимо.

Рецепторы к эстрогенам обладают высокой специфичностью, хотя андрогены также могут связываться с эстрогенными рецепторами в центральной нервной системе. Ряд авторов (McEwen, Pfaff, 1970) наблюдали проявление антиэстрогенного эффекта андрогенов на включение ^3H -эстрадиола в ткани мозга. Для объяснения такого ингибирования может быть высказано два предположения: либо андрогены превращаются в эстрогены путем ароматизации, либо наблюдается специфическое взаимодействие андрогенов с эстрогенными рецепторами (Naess et al., 1974; Naftolin et al., 1975). Второе предположение маловероятно, так как и тестостерон и 5 α -дигидротестостерон являются слабыми конкурентами за эстрадиолсвязывающие места по сравнению с эстрогенами (Muldoon et al., 1974). Вероятно, андрогены модулируют процесс связывания эстрадиола в структурах ЦНС.

Следует отметить особо, что рецептор только тогда может соответствовать своему назначению, когда в дополнение ко всем вышеперечисленным характеристикам будет выполнять и физиологические функции, т. е. воспринимать и передавать ту информацию, которую несут на себе половые гормоны.

Не рассматривая подробно формы существования рецепторов в различных органах и тканях, а также наличие различных рецепторных образований в одном органе, мы остановимся лишь на значимости рецепторов к половым гормонам в гипоталамусе.

Идентификация, изучение физико-химических свойств и топографического распределения стероидных рецепторов в нервных

структурах дали возможность исследователям определить точки приложения этих гормонов. Обычно для этих целей используют три подхода: 1) имплантацию кристаллических гормонов; 2) включение ^3H -гормона в определенные области мозга с последующим изучением цитоплазматических и ядерных рецепторов; 3) ^3H -ауто-радиографическое исследование для составления карты мозга с выделением клеточных групп, обладающих высоким содержанием стероидных рецепторов. Основными задачами проводимых исследований являются изучение: 1) внутриклеточного распределения стероидных рецепторов с уточнением их роли в переносе гормона в ядро и их эффекта на генную экспрессию; 2) прямого эффекта гормонов на нервную ткань; 3) системных реакций влияния половых гормонов, таких, как поведение, становление нейроэндокринной системы в ходе онтогенеза.

Показано, что практически все отделы центральной нервной системы содержат рецепторные места, связывающие все классы стероидных гормонов (McEwen et al., 1982). По своим физико-химическим характеристикам и по стероидной специфичности эти рецепторы аналогичны рецепторам, обнаруживаемым в других органах и тканях. Цитозольные рецепторы, как правило, обладают свойством транслоцироваться в ядро. Однако следует отметить, что не всегда этот процесс сопровождается значительным снижением количества цитоплазматических рецепторов, даже когда ядерная фракция полностью насыщена. Иными словами, эстрогенные и прогестинные рецепторы цитозольной фракции нервных клеток обнаруживаются в избытке и их снижение может достигать 50 %. Восстановление цитозольных рецепторов до исходного уровня происходит в течение 24 ч. В противоположность рецепторам эстрадиола и прогестерона число глюкокортикоидных циторепторов в гиппокампе не снижается даже при полном насыщении ядерных рецепторных мест. Предполагается наличие пула особых рецепторов, которые быстро генерируют и восстанавливаются в их исходном количестве.

Ядерная транслокация гормон-рецепторного комплекса вызывает активацию генома, и это убедительно показано в стероидчувствительных областях мозга. Введение эстрадиола кратковременно активирует полимеразу-2 ядерной РНК в гипоталамусе, не влияя на активность полимеразы-1 (Kelner et al., 1980). Этот факт может быть положен в основу объяснений, почему у взрослых особей не наблюдается гипертрофия и гиперплазия мозга после введения эстрадиола. Имеются и другие доказательства геномного включения в ответ на введение стероидов. Наиболее характерным из них может рассматриваться блокада действия эстрогенов на женское половое поведение и преовуляторный выброс лютеинизирующего гормона после введения актиномицина, ингибирующего синтез ДНК (Kalra, Kalra, 1980).

В результате геномной активации половыми гормонами наблюдается изменение процессов, тесно связанных с метаболизмом нейротрансмиттеров. Так, тестостерон регулирует активность

холинацетилтрансферазы и ацетилхолинэстеразы, а также изменяет число никотиновых холинергических рецепторов (Luine et al., 1980). Увеличение мышечной массы гортани осуществляется этим же путем, что очень важно для регуляции голоса у самцов певчих птиц (Nottenbohm, 1980). Следует подчеркнуть тот факт, что эстрогениндуцируемое увеличение холинацетилтрансферазной активности, наблюдаемое в преоптической области у самок, не отмечается у самцов, и наоборот, андрогенный эффект наблюдается как у самок, так и у самцов, что, по-видимому, связано с метаболизмом тестостерона и синергизмом между эстрадиолом и прогестероном. Превращение тестостерона в 5 α -дигидротестостерон в нервной ткани обеспечивает андрогенный эффект за счет связывания с внутриклеточными андрогенными рецепторами, а ароматизация тестостерона в эстрадиол обеспечивает источник эстрадиола, который взаимодействует *in vivo* с внутриклеточными эстрогенными рецепторными местами. У животных такое превращение важно для активации мужского полового поведения и процессов половой дифференцировки.

Интересным представляется факт новообразования прогестинных рецепторов через эстрогензависимый процесс в нервных клетках, обладающих способностью к ароматизации. Показательным в этом отношении являются линии крыс, имеющих дефицит андрогенных рецепторов: для них характерно появление прогестинных рецепторов после введения тестостерона, главным образом в гипоталамусе, особенно в преоптической области. Интересно, что амигдаллярная область не обладает свойством образовывать прогестинные рецепторы. Индукция прогестинных рецепторов происходит в течение суток, а их исчезновение — в течение 12 ч.

У самок крыс индукция прогестинных рецепторов тесно связана со способностью животных проявлять женское половое поведение, что очень хорошо выражено в вентромедиальной области гипоталамуса, т. е. в области, ответственной за половое поведение.

Представляется целесообразным коснуться также вопроса регуляции нейротрансмиттерных рецепторных образований под влиянием половых стероидов. Известно, например, что 17 β -эстрадиол снижает число серотониновых рецепторных мест и этот эффект воспроизводим *in vitro* на мембранах мозга. Показательно, что количество гипоталамических серотониновых рецепторов снижается в проэструсе, т. е. во время максимального уровня эстрадиола в крови (Biegon et al., 1980). Аналогичный эффект проявляет 2-гидроксиэстрадиол и прогестерон, в то время как кортикостерон и тестостерон не оказывают такого действия (McEwen et al., 1981). Большие дозы 17 β -эстрадиола и 2-гидроксиэстрадиола (10—100 мкМ) также конкурируют за α_1 -адренергические и дофаминергические рецепторные места в мембранах мозга. Описанные выше эффекты имеют место *in vivo* в физиологических условиях.

Однако в настоящее время еще трудно утверждать, вносят ли прямые эффекты половых стероидов, направленные на рецепторы

к нейромедиаторам, вклад в функцию мозга. Наши собственные исследования указывают на наличие такого пути влияния половых гормонов (Бабичев, 1984). В литературе бытует мнение о возможном существовании прямого мембранного воздействия гормонов через катехолэстрогены (Fishman, 1981; Kirchhoff et al., 1981).

В коре мозга кастрированных крыс с имплантацией эстрадиола отмечено снижение количества серотонинергических рецепторов типа 1 и повышено число рецепторов типа 2; введение прогестерона вызывало незначительное увеличение серотонинергических рецепторов типа 2 и уменьшение типа 1, число норадренергических рецепторов не изменялось. Имплантация эстрадиола вместе с прогестероном вызывала подавление зависимо от эстрадиола увеличения серотониновых рецепторов типа 2, при этом число рецепторов типа 1 и β -адренорецепторов уменьшалось. Количество α_1 -адренорецепторов не изменялось (Biegon et al., 1983). Авторы предполагают, что β -адрено- и серотониновые рецепторы типа 2 участвуют в процессах предменструального напряжения или послеродовой депрессии.

В последнее время в литературе затрагивается вопрос о мембранном действии половых стероидов. Так, показано усиление деполяризующего влияния ионов калия на секрецию люлиберина под влиянием эстрогенов (Drouva et al., 1984). Введение овариэктомированным животным 17β -эстрадиола или диэтилстильбестрола в течение 5 суток увеличивало выброс люлиберина на калиевую деполяризацию в 4 раза больший, чем у кастрированных животных, тогда как 17α -эстрадиол или прогестерон были неэффективными. Было также показано, что кастрация снижает количество люлиберина, выделенного *in vitro* из инкубированного медиобазального гипоталамуса самок крыс после его электростимуляции (Dyer et al., 1980).

Приведенные выше данные предполагают негеномный, медиаторный эффект, так как большинство исследователей придерживается той точки зрения, что перикарионы люлиберинпродуцирующих нейронов у крыс локализованы за пределами медиобазального гипоталамуса. Более того, время действия эстрогенов *in vitro*, составляющее 30 мин, не сопоставимо ни с кинетикой гормонорецепторной транслокации и транскрипции, ни с аккумуляцией продуктов транскрипции и трансляции, приводящих к синтезу белка *de novo*. Высказывается предположение, что эффект эстрогенов опосредуется через эстрогенсвязывающие места на мембране, весьма сходные по своим фармакологическим свойствам с цитозольными и ядерными рецепторами. Эстрадиол, меняя свойства мембраны избирательно и специфически оказывает влияние на процесс, связывающий мембранную деполяризацию и экзоцитоз люлиберина. Однако при этом не исключается возможность наличия эстрадиоловых рецепторов на пресинаптической мембране люлиберинпродуцирующих нейронов, наряду с включением гормона в цитозольную, а затем и ядерную фракцию и образованием люлиберина из его предшественников. Под влиянием эстрадиола

меняется соотношение между содержанием люлиберина и иммуно-реактивного высокомолекулярного его предшественника, в результате чего происходит перераспределение люлиберина в нервных окончаниях между растворимой и нерастворимой фракциями (Tytell et al., 1980). Однако реализация эффекта половых гормонов на уровне мембран требует дальнейших исследований с привлечением микроэлектрофизиологических методов. Основной же путь действия гормонов лежит на уровне специфических эстрадиолсвязывающих рецепторных белков, как цитоплазматических, так и ядерных.

Наличие цитоплазматических и ядерных рецепторов определяет и разную их функцию. Если рецепторы цитоплазмы определяют чувствительность нервных клеток к гормону, то ядерные — характер и глубину ответа. Несмотря на свою идентичность, а они по своей природе относятся к кислым белкам, коэффициент седиментации у них разный: у цитоплазматических 8S в среде с низкой ионной силой и 4S в среде с высокой ионной силой, а у ядерных — 5S. Константа ассоциации (K_a), характеризующая степень сродства белков к стероидам, колеблется в пределах 10^9 — 10^{11} M^{-1} , т. е. они обладают высокой степенью сродства к эстрадиолу. Вторым показателем, используемым для оценки рецепторов, является число связывающих мест в том или ином органе (n); если K_a практически одинакова для рецепторов, независимо от их локализации, то число связывающих мест в гипоталамусе к эстрадиолу в 3—10 раз меньше, чем в матке или аденогипофизе. Но такая низкая концентрация их в гипоталамусе обусловлена не малым числом рецепторов на клетку, а незначительным числом рецепторных клеток, локализованных в базальном гипоталамусе.

Общепринятой схемой взаимодействия эстрогенов, как и всех гормонов стероидной природы, с клетками органов-мишеней является их диффузное проникновение в клетку самостоятельно или с помощью белкового носителя (Milgrom et al., 1973) и связывание с цитоплазматическими рецепторами. Образовавшийся гормон-рецепторный комплекс под влиянием температуры или ионной силы подвергается структурной трансформации и приобретает способность транслоцироваться в ядро. В ядре активированный комплекс взаимодействует с акцепторными местами хроматина и благодаря этому инициирует развитие специфических гормональных эффектов, модулируя процессы транскрипции. Цикл рецепции завершается разрушением или вытеснением комплекса из хроматина посредством выключающего механизма. Пул цитоплазматических рецепторов, по-видимому, пополняется за счет биосинтеза их *de novo*, а также реактивации вышедших из ядер рецепторных молекул. Комплекс описанных выше взаимосвязанных процессов, протекающих в определенной последовательности, может иногда осуществляться и в отсутствие гормона, однако гормон, проникший в клетку, усиливает начальные события и приводит к инициации эффекта, который позднее проявляется как общий биологический ответ. Высказывается мнение, что

действие эстрогенов может осуществляться за счет ассоциации их с лизосомами. Однако в настоящее время общепризнанной является модель 2-ступенчатого взаимодействия эстрогенов со своими рецепторами, которая заканчивается связыванием гормона цитоплазматическими и ядерными рецепторами и может служить начальной ступенью последующих процессов, приводящих к изменению репродуктивных функций за счет изменения синтеза и секреции гонадолиберина и гонадотропинов.

Каким же образом происходит этот процесс и какие области гипоталамуса могут быть причастны к нему?

В приведенных нами данных литературы твердо установленным является факт преимущественной локализации рецепторов к эстрогенам в преоптической и аркуатной областях гипоталамуса. Такая топографическая корреляция между эстрогенсвязывающей активностью и физиологическим ответом на эстрадиол определенных областей гипоталамуса предполагает непосредственное участие рецепторной системы в механизме регуляции секреции гонадотропинов гипофиза. Поэтому особый интерес представляет как изучение эстрогенных рецепторов в эстральном цикле, так и поиск корреляции в изменении рецепторной системы со стадиями цикла, что могло бы быть доказательством ее участия в механизме регуляции репродуктивной функции.

ИЗМЕНЕНИЕ РЕЦЕПЦИИ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ В ТЕЧЕНИЕ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА

В работах Като (Kato et al., 1970) были продемонстрированы циклические изменения включения ^3H -эстрадиола *in vivo* и *in vitro* в область переднего, но не среднего и заднего гипоталамуса, а также аденогипофиза и коры. Минимальное включение гормона наблюдалось в стадии проэструс, когда синтез 17β -эстрадиола в яичниках достигал максимума. Снижение включения ^3H -эстрадиола имело место и в стадии эструс, но только в опытах *in vitro*.

Гинзбург с соавторами (Ginsburg et al., 1972, 1975) изучали связывание ^3H -эстрадиола в цитозоле гипоталамуса, гипофиза и матки циклирующих крыс. Было показано, что K_d эстрадиол-рецепторного комплекса цитозоля всех 3 органов не менялась в ходе цикла и была равна 10^{10} M^{-1} , в то время как число связывающих мест снижалось в стадии проэструс до 60—70 % в гипоталамусе и до 40—50 % в гипофизе, одновременно совпадая с выраженным увеличением циркулирующих эстрогенов в крови. Максимальное число рецепторных мест было отмечено в стадии диэструс-2. В матке число рецепторов менялось двуфазно: снижалось в стадии проэструс и диэструс-2, а затем повышалось в стадиях эструс и диэструс-1. Увеличение эстроген-рецепторных мест в цитозоле гипоталамуса начиналось в стадии позднего проэструса и продолжалось до середины стадии диэструс-1. Это увеличение не могло быть снято фенобарбиталом, который блокировал овуляцию.

Снижение связывающей способности рецепторов в стадии проэструс авторы объясняют оккупацией рецепторных мест эндогенным эстрадиолом и последующей транслокацией образовавшегося комплекса в ядро. Пополнение рецепторов обусловлено их ресинтезом, индуцируемым в конце стадии проэструс увеличенным содержанием эстрогенов.

В литературе показаны половые различия рецепторов эстрогенов и прогестиннов в мозгу (Rainbow et al., 1982). У кастрированных самцов обнаружено незначительное по сравнению с самками количество рецепторов эстрогенов и прогестерононов в гипоталамических ядрах, вовлекаемых в регуляцию поведения и нейроэндокринных реакций. Предполагается, что относительная нечувствительность самцов к феминизирующему действию половых гормонов может быть обусловлена частично отсутствием рецепторов этих гормонов.

Имеются сведения о колебании уровня цитозольных рецепторов эстрогенов в гипоталамусе, преоптической области и амигдале у овариэктомированных самок в зависимости от светового режима (Roy et al., 1981). Концентрация рецепторов эстрогенов максимальна в середине светового периода, хотя сродство к гормону одинаково. Введение нембутала предотвращало снижение рецепции гипоталамусом в темновом, а введение мелатонина — в световом периоде. Авторы предполагают, что реализация светового режима осуществляется с участием рецепторов к половым стероидам.

При определении уровня цитоплазматических рецепторов к эстрадиолу в гипофизе и гипоталамусе циклирующих самок крыс была предпринята попытка (Greely et al., 1974) установить закономерность между чувствительностью гипофиза к экзогенному люлиберину и числом рецепторных мест. Оказалось, что в стадии диэструс-2 чувствительность гипофиза к люлиберину была минимальной, тогда как в 13 ч этой стадии отмечен самый высокий уровень связывания эстрадиола в цитозоле гипофиза и гипоталамуса самок крыс. Люлиберин оказывал влияние на секрецию ЛГ на протяжении всей стадии проэструса, начиная с 12 ч, минимальное число связывающих мест в цитозоле гипофиза обнаружено в 12 ч, а в цитозоле гипоталамуса — в 18 ч проэструса.

Определение только цитоплазматических рецепторов к эстрадиолу в центральной нервной системе не дает полной картины связывания гормона в ходе эстрального цикла, поэтому многие исследователи считают, что степень функционального ответа ткани-мишени на действие гормона прямо коррелирует лишь с количеством специфических рецепторов, обнаруженных в клеточных ядрах (Katzenellenbogen, Gorski, 1972; Anderson et al., 1975). Высказанное Гинзбургом предположение о том, что уровень циркулирующего эндогенного эстрадиола в критические стадии эстрального цикла отражает перераспределение эстрогенных рецепторов между цитоплазмой и ядром, требует соответствующих доказательств. Специальное исследование специфического связы-

вания эстрадиола с рецепторами в цитоплазматической и ядерной фракциях аденогипофиза и чувствительности последнего к люлиберину в ходе эстрального цикла подтвердило это предположение (Sen, Menon, 1978). Концентрация рецепторов в цитозоле снижалась в стадии проэструс до 40 %, а в стадии эструс наблюдалось их пополнение. С другой стороны, выраженное увеличение концентрации ядерных рецепторов было отмечено именно в стадии проэструс, а максимальная стимуляция выброса ЛГ под влиянием введенного люлиберина наблюдалась в 13 ч стадии проэструс. Таким образом, результаты работы предполагают наличие тесной связи между секрецией ЛГ, вызванной люлиберином и содержанием рецепторов к эстрадиолу в аденогипофизе крыс в ходе цикла.

Было определено (White et al., 1978) также содержание цитоплазматических и ядерных рецепторов к эстрадиолу в ткани мозга, включающей преоптическую область, гипоталамус, амигдалу и средний мозг. Число ядерных рецепторных мест (фмоль/мозг) изменялось с 6.5 ± 1.71 в проэструсе до 2.06 ± 0.66 в эструсе, число же цитоплазматических рецепторов колебалось от 36.40 ± 11.4 в проэструсе до 72.60 ± 13.6 в метэструсе. Таким образом, повышение концентрации ядерных рецепторов в гипоталамусе в стадии проэструс сопровождалось истощением уровня цитоплазматических рецепторов. Наблюдаемые изменения содержания ядерных рецепторов к эстрадиолу в гипоталамусе в ходе эстрального цикла коррелировали с изменениями концентрации этого гормона в плазме крови.

В большинстве работ по изучению числа эстрадиолсвязывающих мест в гипоталамусе в ходе цикла определение велось в целом мозге, не только без учета ядер определенных его образований, но и без деления мозга на отдельные структуры. Лишь небольшое число исследований проведено по определению содержания цитоплазматических и ядерных рецепторов в преоптико-передней гипоталамической области, ответственной за циклическую регуляцию секреции гонадотропных гормонов, а также в области срединного возвышения и аркуатных ядер, т. е. в центре тонической регуляции (Vertes et al., 1977). Минимальное число цитоплазматических и ядерных рецепторов к эстрадиолу в обеих областях гипоталамуса, регулирующих секрецию гонадотропинов, было отмечено в стадии проэструс, а максимальное — в стадиях эструс и диэструс-1. В отличие от гипоталамуса (в ядерной фракции матки) самое низкое связывание эстрадиола наблюдалось в стадии эструс, а самое высокое — в стадиях диэструс и проэструс. Циклические изменения в связывании эстрадиола в ядерной фракции аденогипофиза были аналогичны изменениям в матке. Существенных изменений в связывании ^3H -эстрадиола в дорсальном гипоталамусе и коре авторам обнаружить не удалось.

Анализ данных литературы показывает, что циклические изменения концентрации цитоплазматических и ядерных рецепторов к эстрадиолу в гипофизе и матке на разных стадиях цикла были параллельны изменениям секреции эстрогенов, в отношении же

рецепторов к эстрадиолу в гипоталамусе выявляются противоречия. Большинство цитированных авторов не учитывали тот факт, что концентрация эстрадиола в крови меняется не только в отдельные стадии цикла, но и по ходу каждой стадии. Поэтому наблюдаемые изменения содержания гипоталамических рецепторов к эстрадиолу полностью не могли быть учтены.

Определение концентрации цитозольных рецепторов прогестинов в гипоталамусе на протяжении цикла и при индукции ложной беременности показало их увеличение в начале стадии эструса более чем в 100 раз в преоптической области и в 3 раза в медиобазальном гипоталамусе. В стадии диэструс колебания содержания этих рецепторов отмечены не были. Однако при ложной беременности первому пику выброса прогестерона предшествовало повышение содержания рецепторов прогестинов в преоптической области, что, по-видимому, вызывает стимуляцию секреции прогестерона. Второе повышение содержания рецепторов прогестинов совпадает во времени с возрастанием концентрации этих гормонов в крови. У интактных самок первый выброс пролактина отсутствует, а увеличение содержания рецепторов прогестинов в преоптической области наблюдается на фоне низкой концентрации прогестинов в крови. Предполагается, что ложная беременность влияет на спонтанные колебания содержания рецепторов прогестинов в нейронах гипоталамуса, принимающих участие в регуляции секреции пролактина (Takahashi, Saito, 1983).

Приведенные выше факты дают общую информацию о существовании рецепторных белков в структурах центральной нервной системы, специфически связывающих половые гормоны и тем самым принимающих участие в регуляции гонадотропной функции гипофиза. Мы поставили задачу определить роль и значение цитоплазматических и ядерных рецепторов, локализованных в преоптической области гипоталамуса, определяющей циклический выброс гонадотропинов, а также в области аркуатных ядер срединного возвышения, т. е. в центре тонического выделения гонадотропинов, в общей системе регуляции овуляторного цикла с учетом не только отдельных стадий цикла, но и определенных временных интервалов каждой из них. Наши исследования были направлены на изучение вопроса о том, в какой степени изменения в концентрации рецепторов к эстрадиолу в этих двух областях гипоталамуса обеспечивают нормальное протекание эстрального цикла у взрослых самок крыс.

Исследование величины K_d и концентрации специфических, связывающих эстрадиол мест в двух областях гипоталамуса — преоптической области и части переднего гипоталамуса — и области аркуатного ядра — срединного возвышения были проведены у взрослых циклирующих крыс в разные интервалы времени (10, 13, 15, 18 ч) на всех стадиях эстрального цикла.

Как видно из полученных данных (см. таблицу), концентрация рецепторов к эстрадиолу в обеих областях гипоталамуса претерпевала значительные изменения на разных стадиях эстрального

Величины константы ассоциации (K_a) и концентрации специфических связывающих эстрадиол мест (N_c) в отделах гипоталамуса самок крыс в зависимости от стадии эстрального цикла ($M \pm m$)

Стадия цикла	Время забоя, ч	Преоптическая область						Область аркуатного ядра — срединного возвышения					
		цитозол			ядерная фракция			цитозол			ядерная фракция		
		N_c моль/мг белка $\times 10^{-13}$	K_a $M^{-1} \times 10^{10}$	N_c моль/мг ДНК $\times 10^{-11}$	K_a $M^{-1} \times 10^9$	N_c моль/мг белка $\times 10^{-13}$	K_a $M^{-1} \times 10^{10}$	N_c моль/мг ДНК $\times 10^{-11}$	K_a $M^{-1} \times 10^9$	N_c моль/мг белка $\times 10^{-13}$	K_a $M^{-1} \times 10^{10}$	N_c моль/мг ДНК $\times 10^{-11}$	K_a $M^{-1} \times 10^9$
Д ₁	10	3.3 ± 0.1	1.2 ± 0.4	0	0	2.8 ± 0.8	1.3 ± 0.4	0	0	0	0	0	0
	13	6.9 ± 1.1	0.6 ± 0.2	0	0	3.9 ± 0.6	1.1 ± 0.2	0	0	0	0	0	0
	15	0	0	21.4 ± 1.3	1.3 ± 0.2	3.6 ± 0.4	1.0 ± 0.4	15.9 ± 2.6	1.9 ± 0.1	0	0	0	0
Д ₂	10	3.0 ± 0.8	1.2 ± 0.3	0	0	3.1 ± 0.8	1.3 ± 0.4	0	0	0	0	0	0
	13	7.0 ± 1.1	0.6 ± 0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	15	3.4 ± 0.3	1.2 ± 0.3	27.1 ± 2.8	1.3 ± 0.2	7.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1	14.5 ± 2.0	1.5 ± 0.5	0	0	0	0
	18	5.7 ± 0.8	0.8 ± 0.2	14.2 ± 0.9	1.0 ± 0.2	7.1 ± 0.9	0.8 ± 0.1	39.9 ± 4.4	0.9 ± 0.1	0	0	0	0
П	10	3.3 ± 0.5	1.1 ± 0.2	0	0	6.0 ± 0.5	0.8 ± 0.3	0	0	0	0	0	0
	13	0	0	25.4 ± 6.0	1.4 ± 0.3	7.5 ± 0.6	0.6 ± 0.1	22.1 ± 1.8	1.2 ± 0.1	0	0	0	0
	15	0	0	25.3 ± 3.3	1.9 ± 0.5	2.4 ± 0.5	1.4 ± 0.4	49.2 ± 6.5	1.2 ± 0.2	0	0	0	0
	18	0	0	30.6 ± 2.6	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.2	1.4 ± 0.3	36.1 ± 6.2	1.3 ± 0.1	0	0	0	0
Э	10	5.4 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0	0	3.2 ± 0.5	1.2 ± 0.2	0	0	0	0	0	0
	13	6.5 ± 1.1	1.2 ± 0.2	14.3 ± 1.7	1.4 ± 0.1	2.7 ± 0.4	1.2 ± 0.2	10.3 ± 1.1	2.0 ± 0.3	0	0	0	0
	15	0	0	12.4 ± 1.5	1.5 ± 0.5	4.1 ± 0.8	1.0 ± 0.2	6.3 ± 1.3	2.0 ± 0.4	0	0	0	0

Примечание. Д₁, Д₂ — стадии диэструса, П — проэструс, Э — эструс.

цикла и в зависимости от времени суток в каждой стадии. Низкая концентрация цитоплазматических рецепторов в преоптической области отмечена в 10 ч утра на стадиях диэструс-1 и диэструс-2, а в 13 ч дня это число вдвое увеличилось. На стадии диэструс к 15 ч дня концентрация эстрогенных рецепторов в преоптической области снижалась, достигая таких же значений, что и в 10 ч утра, к 18 ч вечера число рецепторных мест достоверно повышалось.

На стадии эструс в 10 ч утра количество рецепторных молекул превышало таковое в остальные стадии цикла, а в 13 ч дня приближалось к максимальным значениям, отмеченным на стадиях диэструс-1 и диэструс-2.

Во все исследуемые временные интервалы стадии проэструс цитоплазматические рецепторы эстрадиола не были обнаружены в преоптической области, за исключением 10-часового интервала, когда их концентрация достигла пределов тех значений, которые были характерны для эстрального цикла. Цитоплазматические рецепторы к эстрадиолу не были обнаружены и в 15 ч дня стадий диэструс-1 и эструс, K_d для циторекцепторов преоптической области в ходе цикла изменялась незначительно.

Ядерные рецепторы к эстрадиолу в преоптической области не обнаруживались в утренние часы всех стадий цикла и в 13 ч дня стадии диэструс. Низкая концентрация ядерных эстрадиолсвязывающих мест отмечалась также в 13 и 15 ч стадии эструс. Увеличение их числа было отмечено в 15 ч стадии диэструс-1 и особенно диэструс-2. В этот срок число ядерных рецепторов было большим, чем в 18 ч стадии диэструс-2, а также стадии проэструс в дневные часы. Таким образом, изменение числа ядерных мест связывания в преоптической области весьма существенно на протяжении всего эстрального цикла, а K_d менялась мало, в пределах $1.0-1.9 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$.

В области аркуатного ядра и срединного возвышения циторекцепторы к эстрадиолу были обнаружены во все стадии цикла и во все временные интервалы, за исключением 13 ч дня стадии диэструс-2. Максимальная их концентрация выявлена на этой стадии в 15 и 18 ч и на стадии проэструса в 10 ч утра и 13 ч дня. Уменьшение числа рецепторных мест отмечено в 15 и 18 ч стадии проэструс по сравнению с 13 ч дня этой же стадии цикла. Во все интервалы стадий диэструс-1 и эструс число цитоплазматических рецепторов оставалось примерно одинаковым, хотя и было в 2 раза меньшим, чем в 15 и 18 ч стадии диэструс-2 в 10—13 ч стадии проэструс. K_d циторекцепторов в этой области менялась мало и практически не отличалась от таковой для циторекцепторов преоптической области.

Ядерные рецепторы к эстрадиолу в области аркуатного ядра и срединного возвышения не выявлялись в те же часы стадий цикла, что и в преоптической области. Небольшая их концентрация была выявлена в 13 и 15 ч стадии эструс. Высокий уровень ядерных эстрадиолсвязывающих мест был обнаружен в 18 ч стадии диэструс-2, превышающий вдвое их уровень в 15 ч той же стадии.

K_d для ядерных рецепторов в медиобазальном гипоталамусе в ходе цикла изменялась незначительно, так же как и в преоптической области.

Специфичность связывания эстрогенных рецепторов была установлена методом конкурентного замещения ^3H -эстрадиола различными немечеными гормонами. Показано, что у циклирующих самок крыс связывание ^3H -эстрадиола в обеих фракциях гипоталамуса в присутствии избытка немеченого эстрадиола и диэтилstilбестрола снижалась на 40—50 %, а в присутствии тестостерона — только на 4—10 %. Следовательно, рецепторы к эстрадиолу обладали высокой стереоспецифичностью.

Как видно из данных, представленных в таблице, наиболее существенные изменения в концентрации цитоплазматических и ядерных рецепторов к эстрадиолу отмечались во второй половине дня стадий диэструс-2 и проэструс. В ряде работ, посвященных изучению содержания рецепторов к эстрадиолу в ходе эстрального цикла (Ginsburg et al., 1975; White et al., 1978), показано значительное снижение цитоплазматических и увеличение ядерных рецепторов в целом гипоталамусе в проэструс. В одной из работ (Vertes et al., 1977) определяли концентрацию эстрадиолсвязывающих мест в преоптико-переднем и медиобазальном гипоталамусе и обнаружили минимальное число связывающих мест в стадии проэструс и максимальное в стадии метэструс.

Измерение связывающей емкости цитоплазматических рецепторов в целом гипоталамусе в разные промежутки времени стадий цикла показало (Greely et al., 1975), что самая высокая концентрация рецепторных мест наблюдалась в 13 ч утра стадии диэструс-2, а в другие интервалы она снижалась. На стадии проэструс количество рецепторных мест уменьшалось в еще большей мере, достигая минимального значения в 18 ч вечера. В этот период происходило 20-кратное снижение связывающей емкости цитоплазматических эстрогенных рецепторов по сравнению с утренними часами, а в 20 и 22 ч стадии проэструс связывающая емкость снова повышалась и оставалась на таком уровне в течение стадии эструс. Трудно сравнивать эти результаты с нашими данными, однако можно заметить, что динамика изменения цитоплазматических рецепторов к эстрадиолу в преоптической области гипоталамуса в наших экспериментах практически не отличалась от таковой в целом гипоталамусе.

В настоящее время многие исследователи придерживаются мнения, что уровень цитоплазматических рецепторов определяет чувствительность клетки-мишени к гормону (Юдаев и др., 1976; Розен, 1981). Анализ данных, полученных нами по всем стадиям цикла, показал, что число цитоплазматических эстрадиолсвязывающих мест во второй половине диэструс-2 (15 и 18 ч) и первой половине проэструс (10 и 13 ч) было самым высоким в аркуатном ядре и срединном возвышении, превышающим в 2 раза их число в преоптической области. На этом основании можно сделать вывод о более высокой чувствительности области аркуатного ядра —

срединного возвышения к эстрогенам. Такой вывод подтверждает высказанное ранее Бабичевым (1981) предположение о более высокой чувствительности нейронов аркуатной области по сравнению с преоптической областью к половым гормонам и как следствие этого — более раннем включении структур аркуатного ядра в систему положительной обратной связи.

В литературе имеются убедительные доказательства того, что эстрогены оказывают существенное влияние на секрецию гонадотропинов и что это влияние проявляется через взаимодействие с эстрогенными рецепторами в преоптической области, медиобазальном гипоталамусе и гипофизе (Menon, Gunaga, 1976; Goodman, 1978; McEwen et al., 1978). Поэтому наличие рецепторов к эстрадиолу и их число в различных гипоталамических структурах в зависимости от стадии цикла, по-видимому, будет определять направленность ответной реакции механизма овуляторного выброса ЛГ под влиянием циркулирующего в крови эстрогена как запускающего фактора.

Поскольку уровень эстрадиола в крови колеблется не только в зависимости от стадии эстрального цикла, но и по ходу каждой стадии, наблюдаемые нами изменения в концентрации эстрогенных рецепторов в изучаемых областях гипоталамуса в первую очередь будут связаны именно с этими колебаниями. При исследовании в нашей лаборатории содержания эстрадиола в крови в ходе эстрального цикла было найдено, что самый низкий уровень эстрадиола устанавливался на протяжении всей стадии диэструс-1 и первой половины дня стадии диэструс-2. В последующие часы этой стадии наблюдалось постепенное повышение уровня эстрадиола в крови, достигающее максимума к 12 ч дня стадии проэструс. К 15 ч дня этой стадии содержание эстрадиола в крови снижалось, но было все еще выше, чем в остальные стадии цикла, а к 18 ч этой стадии его уровень был снижен уже вдвое. В полдень стадии эструс концентрация эстрадиола в крови практически не отличалась от таковой в 18 ч стадии проэструс. Такую же картину в изменении содержания эстрадиола в сыворотке крови самок крыс в ходе эстрального цикла и по часам обнаружили и другие авторы (Kalra, Kalra, 1977).

Изучение динамики изменения содержания ЛГ в крови самок крыс в ходе эстрального цикла (Бабичев, Адамская, 1976) показало, что овуляторный выброс ЛГ в кровь соответствует 18 ч стадии проэструс, хотя уровень гормонов уже повышен в 15 ч этой стадии. Затем концентрация ЛГ в крови колебалась от 20.6 нг/мл в 15 ч стадии эструс до 157.0 нг/мл в 15 ч стадии диэструс-2.

Таким образом, стадия диэструс-1 и первая половина стадии диэструс-2 (10 и 13 ч) характеризовались низкими концентрациями эстрадиола и ЛГ в крови, а также цитоплазматических рецепторов к эстрадиолу в обеих областях гипоталамуса, за исключением 13 ч дня стадий диэструс-1 и диэструс-2. Ядерные же рецепторы к эстрадиолу либо совсем в эти периоды не обнаружи-

вались, либо их концентрация была низкой. Эти изменения, по-видимому, можно объяснить тем, что на фоне низкого уровня эстрадиола в крови эстроген мало связывается в цитоплазме и лишь незначительное его количество транспортируется в ядра. Мы отмечали, что самый низкий уровень ЛГ в крови наблюдался также на стадии диэструс-1 и в первой половине дня стадии диэструс-2. Если влияние эстрогенов на секрецию гонадотропинов гипофизом осуществляется через взаимодействие их со специфическими рецепторами в ЦНС, то, по-видимому, снижение уровня ЛГ в крови связано с низким содержанием рецепторов в гипоталамусе. Следовательно, на стадиях диэструс-1 и диэструс-2 (10 и 13 ч) эстрадиол через его ядерные рецепторы в обеих областях гипоталамуса не вызывает заметных сдвигов в гонадотропной функции гипофиза, обеспечивая состояние относительного покоя системы гипоталамус—гипофиз—гонады у самок крыс.

Во второй половине стадии диэструс-2 содержание эстрадиола в крови увеличивалось вдвое по сравнению с его уровнем на стадии диэструс-1 и первой половине стадии диэструс-2, и это сразу отразилось на изменении в концентрации эстрогенных рецепторов в обеих областях гипоталамуса. В 15 ч дня стадии диэструс-2 число цитоплазматических эстрогенсвязывающих мест в преоптической области было низким и достоверно повышалось к 18 ч этой стадии. Число цитоплазматических эстрадиолсвязывающих мест в аркуатном ядре и срединном возвышении было максимальным в 15 и 18 ч стадии диэструс-2. Концентрация же ядерных рецепторов была высокой в преоптической области, но низкой в аркуатном ядре и срединном возвышении в 15 ч дня, а в 18 ч, наоборот, низкой в преоптической области и высокой в области аркуатного ядра — срединного возвышения. Невысокий уровень связывания эстрадиола в цитозоле и высокий в ядре, наблюдаемый в преоптической области в 15 ч дня, вероятно, связан с повышенной транслокацией цитоплазматического эстрадиол-рецепторного комплекса в ядро, и это сочетается с возрастанием концентрации ЛГ в крови. По данным Бабичева и Адамской (1976), концентрация ЛГ в крови в 15 ч дня стадии диэструс-2 была намного выше, чем в остальные часы стадий диэструс-1 и эструс. Высокую концентрацию цитоплазматических и ядерных рецепторов в аркуатном ядре и срединном возвышении в 18 ч стадии диэструс--2, вероятно, можно объяснить повышением процесса синтеза цитоплазматических рецепторов и повышенной транслокацией эстрадиол-рецепторного комплекса в ядро.

Ввиду того, что гонадолиберин участвует в регуляции секреции ЛГ из гипофиза, можно предположить, что изменения в содержании ЛГ в гипофизе и крови должны быть связаны с изменениями в выработке ЛГ-РГ гипоталамусом. Наибольшая концентрация люлиберина была обнаружена в срединном возвышении и в области аркуатно-вентромедиальных ядер, т. е. в зоне центра тонической секреции гонадотропинов, особенно на стадии проэструс (Баранов и др., 1971; Domanski et al., 1980). Механизм, посредством которого

эстрогены влияют на повышенный выброс ЛГ, не известен. Не исключена возможность облегчающего действия эстрогенов на синтез люлиберина в нейросекреторных клетках медиобазального гипоталамуса (Kalra, Kalra, 1980), хотя есть мнение (Kato, 1974), что влияние эстрогенов на секрецию либерина срединным возвышением осуществляется через их взаимодействие со специфическими рецепторами в этой области гипоталамуса. Следовательно, можно предположить, что концентрация ядерных рецепторов к эстрадиолу в области аркуатного ядра — срединного возвышения — связана с уровнем люлиберина в этой области. Интересно отметить, что обнаруженные в нашей работе циклические изменения в числе ядерных эстрадиолсвязывающих мест в аркуатном ядре и срединном возвышении коррелируют с циклическими колебаниями в содержании люлиберина, отмеченными в работе Шоверса и Мак-Кана (Chowers, McCann, 1965). Так, по данным этих авторов, содержание люлиберина в гипоталамусе крыс было наибольшим к вечеру позднего диэструса и падало в проэструсе к 12 ч дня. И в наших экспериментах наблюдалась очень высокая, приближающаяся к максимальным значениям, концентрация ядерных рецепторов к эстрадиолу в аркуатном ядре и срединном возвышении диэструс-2, которая затем снижалась до неопределяемых величин в 10 ч утра стадии проэструс.

Как уже было отмечено нами ранее, максимальный уровень эстрадиола в крови у крыс регистрировался на стадии проэструс в 12 ч дня, когда концентрация гонадотропинов находилась на низком уровне. К 13 и 15 ч стадии проэструс содержание эстрадиола в крови уменьшалось, хотя и превышало его уровень в остальные стадии эстрального цикла. Это отразилось и на концентрации эстрогенных рецепторов в гипоталамусе, причем число цитоплазматических эстрадиолсвязывающих мест в аркуатном ядре и срединном возвышении в 13 ч дня стадии проэструс оставалось на таком же максимальном уровне, что и в 15 и 18 ч стадии диэструс-2 и 10 ч стадии проэструс, а концентрация ядерных рецепторов значительно увеличивалась после снижения в 10 ч стадии проэструс. По-видимому, в 13 ч стадии проэструс происходит синтез цитоплазматических рецепторов *de novo*, и транслокация рецепторного комплекса в ядро начинает заметно усиливаться. К 15 ч дня наблюдалось резкое снижение концентрации цитоплазматических рецепторов до ее минимальных значений, тогда как число ядерных рецепторных мест достигало максимума, т. е. в это время эстроген-рецепторный комплекс с высокой скоростью поступал в ядро клетки. Именно в 15 ч стадии проэструс было обнаружено резкое увеличение в секреции люлиберина, о котором судили по повышению его уровня в крови и медиобазальном гипоталамусе (Fink, Jamieson, 1976; Kalra et al., 1976). Эта быстрая секреция люлиберина, по-видимому, предшествует преовуляторному выбросу ЛГ, который наблюдается между 17—18 ч. Такая взаимосвязь между высокой концентрацией ядерных рецепторов к эстрадиолу и содержанием люлиберина на стадии

проэструс указывает на участие эстрогенных рецепторов аркуатного ядра и срединного возвышения в секреции люлиберина.

В 18 ч стадии проэструс уровень эстрадиола в крови был ниже, чем в 13 и 15 ч, но, вероятно, оказался достаточным, чтобы обеспечить все еще высокую скорость транслокации гормон-рецепторного комплекса в ядро. Концентрация цитоплазматических рецепторов в медиобазальном гипоталамусе оставалась минимальная, как и в 15 ч стадии проэструс, а концентрации ядерных рецепторов хотя и снижалась (на 25 %), была достаточно высокой и превышала максимальные значения числа рецепторных мест в преоптической области на стадии проэструс в 18 ч. Тот факт, что содержание люлиберина в крови начинает снижаться перед достижением пика ЛГ, а в медиобазальном гипоталамусе оно остается повышенным в этот период (Kalra, Kalra, 1977), позволяет высказать предположение, что ядерные рецепторы в области аркуатного ядра — срединного возвышения могут определять действие эстрадиола не только на секрецию, но и на синтез люлиберина в этой области.

На фоне значительного увеличения концентрации ядерных рецепторов к эстрадиолу в преоптической области в 13, 15 и 18 ч стадии проэструс наблюдалось значительное истощение цитоплазматических рецепторов, возможно, за счет быстрой транслокации гормон-рецепторного комплекса в ядро, стимулированной эстрадиолом. Такое существенное перераспределение в концентрации рецепторных молекул между цитоплазматической и ядерной фракциями гипоталамуса наблюдалось исключительно в преоптической области во второй половине стадии проэструс и определенным образом должно быть связано с физиологическим ответом ткани.

Работы, касающиеся распределения люлиберина в ЦНС крыс, показали, что он в основном локализован в области аркуатного ядра — срединного возвышения, однако значительные его количества обнаружены и в преоптической области (Advis et al., 1980). Синтезированный в преоптической области люлиберин поступает затем в область аркуатного ядра, пополняя его запасы. Показано также, что уровень люлиберина в преоптической области, как и в области аркуатного ядра, претерпевал существенные суточные изменения в ходе эстрального цикла (Kalra, 1976).

Как отмечалось выше, невысокий уровень связывания эстрадиола в цитозоле и высокий в ядре, наблюдаемый в преоптической области в 15 ч дня стадии диэструс-2, по всей видимости, связан с повышенной транслокацией цитоплазматического рецепторного комплекса в ядро. В это же время наблюдалось значительное увеличение концентрации ЛГ в крови. Если учесть, что в 15—17 ч стадии диэструс-2 содержание люлиберина в преоптической области было значительно выше, чем в остальные часы стадий цикла (Kalra, 1976), то не исключена возможность, что повышенный транспорт рецепторного комплекса из цитоплазмы в ядро обеспечивает и более высокую скорость синтеза специфических

пукленновых кислот и белка. Таким специфическим белком, вероятно, может быть люлиберин. Снижение концентрации ядерных рецепторов к 18 ч стадии диэструс-2 и еще большее к 10 ч стадии проэструс коррелировало с истощением люлиберина в преоптической области в эти часы. К 8—10 ч стадии проэструс содержание люлиберина достигало минимальных величин. Такое истощение люлиберина, по-видимому, связано с его поступлением в область меднобазального гипоталамуса, где он и накапливался до определенного момента.

Новая волна повышения содержания люлиберина с 10 ч и продолжающаяся до 20 ч стадии проэструс хорошо согласуется с максимальным количеством ядерных рецепторных мест в 13, 15 и 18 ч. Следовательно, можно предположить, что ядерные рецепторы в преоптической области являются посредниками повышенного синтеза люлиберина во второй половине стадии проэструс. Преовуляторный выброс ЛГ, паблюдаемый у циклирующих самок крыс в 18 ч стадии проэструс, совпадал с очень высоким числом ядерных эстрогенсвязывающих мест в гипоталамусе в этот временной интервал.

Если исходить из представления о том, что эстрадиол через его ядерные рецепторы в преоптической области может оказывать стимулирующее влияние на синтез люлиберина, то обнаруженную низкую активность люлиберина в преоптической области в 8—12 ч каждого дня цикла можно, по-видимому, объяснить низкой концентрацией ядерных эстрогенных рецепторов в эти часы. Действительно, в своей работе мы показали снижение концентрации ядерных рецепторов в преоптической области до неопределяемых величин в утренние часы всех стадий цикла.

После истощения цитоплазматических эстрогенных рецепторов в преоптической области на стадии проэструс их пополнение происходило через 16—19 ч на стадии эструс в 10 и 13 ч, концентрация же ядерных рецепторов снижалась до очень низких значений. Наши данные согласуются с данными других авторов (Cidlowsky, Muldoon, 1974) о максимальном пополнении цитоплазматических рецепторов к эстрадиолу в гипоталамусе у взрослых интактных самок крыс через 15—20 ч после истощения рецепторного пула. Такая перестройка в концентрации рецепторных молекул в обеих фракциях может быть связана как с рецикличностью отработанных рецепторов ядер обратно в цитоплазму, так и с синтезом цитоплазматических рецепторов *de novo*. К 15 ч стадии эструс концентрация эстрадиола в крови значительно снижалась, так же как и число связывающих мест в цитозоле, а число ядерных рецепторов оставалось низким и в 13 ч этой стадии.

В области аркуатного ядра — срединного возвышения — число цитоплазматических рецепторов, обнаруженных во второй половине стадии проэструс, было равным таковому на стадии эструс, а концентрация ядерных рецепторов снижалась до минимальных величин.

Следует подчеркнуть, что после овуляции запасы люлиберина

в области аркуатного ядра, а также содержание ЛГ в крови падали и устанавливались в дальнейшем на низком уровне на стадии эструс (Бабичев, Адамская, 1976; Баранов и др., 1977; Kalra, Kalra, 1977), и эта стадия полового цикла характеризовалась как низкой концентрацией ядерных рецепторов к эстрадиолу в обеих фракциях гипоталамуса, так и низким содержанием люлиберина и ЛГ. Можно предположить, что число ядерных рецепторов является определяющим фактором в изменении уровня обоих гормонов. Таким образом, на стадии эструс ядерные рецепторы к эстрадиолу в обеих областях гипоталамуса находятся в состоянии относительного функционального покоя, продолжающегося и на стадии диэструс, а затем цикличность в изменении концентрации рецепторов повторяется.

В своей работе мы проводили измерение числа эстрадиолсвязывающих мест не только в гипоталамусе, но и в коре головного мозга у циклирующих самок крыс и показали, что связывание ³H-эстрадиола в этой области мозга не изменялось в разные стадии цикла. В этом отношении наши результаты согласуются с данными ряда исследователей, которые также не обнаружили эстрогенных рецепторов в коре мозга в ходе эстрального цикла (Ginsburg et al., 1975; Vertes et al., 1977).

В заключение можно сделать вывод о том, что рецепторы к эстрадиолу в гипоталамусе причастны к регуляции эстрального цикла у взрослых самок крыс. Наличие цитоплазматических рецепторов к эстрадиолу в аркуатном ядре и срединном возвышении во все временные интервалы каждой стадии эстрального цикла указывает на постоянное включение этой области гипоталамуса в систему контроля гипофиз—гонады. Постепенно увеличивающаяся с 15 ч стадии диэструс-2 концентрация эстрадиола в крови обуславливает стимуляцию преоптической области, т. е. центра циклической регуляции за счет резкого увеличения числа ядерных рецепторов к эстрадиолу. Все это свидетельствует о периодическом включении преоптической области в систему положительной обратной связи.

Полученные нами данные по изучению динамики числа эстрогенсвязывающих мест в двух областях гипоталамуса, ответственных за регуляцию освобождения гонадотропинов гипофиза, в разное время суток каждой стадии цикла свидетельствуют о том, что повышенная концентрация ядерных рецепторов в обеих областях гипоталамуса коррелирует с повышенной концентрацией люлиберина в этих же областях и в крови, а также и ЛГ в крови. Наиболее выраженная картина наблюдалась во второй половине дня стадии диэструс-2 и проэструс. В эти стадии цикла начинается увеличение содержания эстрадиола в крови, достигающее своего максимального значения в 12 ч стадии проэструс. В 13 и 15 ч стадии проэструс начинает повышаться и концентрация ЛГ в крови, а в 18 ч этой стадии отмечалась преовуляторная мобилизация гонадотропинов из гипофиза (Kalra, Kalra, 1977).

Было также показано (Ginsburg et al., 1975), что введение

фенобарбитала циклирующей самке крысы до наступления «критического периода» запуска процесса овуляции в 13 ч стадии проэструс в первую очередь отражалось на уровне цитоплазматических рецепторов. Наблюдаемое в норме повышение числа эстрадиолсвязывающих мест через 15—20 ч после их истощения на стадии проэструс в данном случае отсутствовало, и в конце этого периода концентрация рецепторных мест в цитоплазме была значительно ниже, чем у животных, которым не вводился блокатор овуляции. Параллельно снижению числа эстрогенных рецепторов в гипоталамусе отмечалось замедление секреции ЛГ на 24 ч. Эти факты говорят о прямой причастности рецепторов эстрадиола в гипоталамусе к включению механизмов, регулирующих выделение ЛГ.

Доказанный нами ранее механизм последовательного включения (Бабичев, 1981) вначале области аркуатных ядер, а затем преоптической области, обусловленный разной их чувствительностью к половым гормонам, в механизм овуляторного выброса ЛГ в кровь подтверждается и данными по определению рецепторов в гипоталамусе в ходе цикла. Высокие концентрации ядерных рецепторов к эстрадиолу в преоптико-переднегипоталамической области и области аркуатного ядра — срединного возвышения — во второй половине дня стадии проэструс свидетельствуют о том, что периодическое включение обоих центров гипоталамуса определяется концентрацией эстрогенных рецепторов в ядре. Максимальная концентрация ядерных рецепторов в преоптической области, наблюдаемая в 13 ч стадии проэструс, совпадала с максимальной концентрацией эстрадиола в крови, хотя содержание ЛГ в крови в это время было невысоким. Число эстрадиолсвязывающих мест в ядерной фракции медиобазального гипоталамуса в 13 ч этой же стадии достигало таких же значений, что и в преоптической области, однако эти величины были далеки от максимальных, имеющих место в 15 ч стадии проэструс. К 18 ч концентрация ядерных рецепторов аркуатного ядра и срединного возвышения хотя и снижалась, но оставалась на высоком уровне.

Вероятно, увеличивающаяся концентрация эстрадиола в крови обуславливает стимуляцию циклического центра за счет резкого повышения числа ядерных гормональных рецепторов, которые в свою очередь обеспечивают дополнительное увеличение синтеза люлиберина. Однако секреция ЛГ в это время незначительна, и это объясняется, по-видимому, низким числом ядерных эстрогенных рецепторов в медиобазальном гипоталамусе, недостаточной стимуляцией тонического центра. Снижение уровня эстрадиола в крови к 15 и 18 ч стадии проэструс не меняло концентрацию ядерных рецепторов в преоптической области, но стимулировало их увеличение в аркуатной области и срединном возвышении, особенно к 15 ч дня. Дополнительная стимуляция тонического центра обеспечивала значительное увеличение синтеза и секреции люлиберина, вызывающего быстрое преовуляторное освобождение гонадотропинов из гипофиза. При сопоставлении характера изменений уровня ядерных рецепторов к эстрадиолу в преоптической

области и аркуатных ядрах — срединном возвышении — обращает на себя внимание наличие строгой суточной ритмики. Она характеризуется нулевыми значениями ядерных рецепторов в утренние часы стадий цикла и резким подъемом их концентрации во второй половине дня.

Таким образом, можно утверждать, что наличие рецепторного аппарата в гипоталамусе крыс к половым гормонам является необходимым, а возможно и определяющим, фактором регуляции всего процесса овуляции. Отсутствие рецепторов в органах-мишенях исключает возможность действия соответствующих гормонов, что имеет место при некоторых эндокринных заболеваниях, как центрального генеза, например тестикулярной феминизации, так и первичного происхождения, например при неразвивающейся беременности (Attardi et al., 1976; Юдаев и др., 1976).

Важность гормональной рецепции зависит не только от характера участия ее в выбросе гонадотропинов, но и от того, с каким рецепторным «багажом» входит в репродуктивный период данная особь.

В этом отношении важно проанализировать «организующий» и «активирующий» эффекты половых гормонов в ходе онтогенеза.

ИЗМЕНЕНИЕ РЕЦЕПЦИИ В ОНТОГЕНЕЗЕ

«Организирующие» эффекты половых гормонов представляют собой влияние их на развитие мозга в критический период половой дифференцировки, который в зависимости от вида млекопитающих имеет различную продолжительность и протекает в различное время. Например, у крыс он начинается пренатально и продолжается первые 5—7 сут после рождения, а у человека охватывает 4—7 мес внутриутробного развития (Бабичев, 1981; Резников, 1982).

«Организирующее» действие стероидов меняет ответ нервных клеток к электрической или химической стимуляции. Наиболее интересным вопросом, касающимся организующего и активирующего влияния гормонов, является тот факт, что один и тот же тип эстрогенных рецепторов включается в оба процесса, однако последовательность этих функций в каждом процессе различна.

Подобно морфологической половой дифференцировке репродуктивного тракта имеют место и половые различия нервных структур в ходе онтогенеза под влиянием гормонов. Кастрация самцов при рождении приводит к потере мужского репродуктивного поведения, а после обработки эстрадиолом и прогестероном у них наблюдается преовуляторный «выброс» ЛГ. Самки крыс, получившие разовую дозу тестостерона, характеризуются подавлением женского полового поведения. Дефеминизация крыс вызывается как эстрогенами, так и андрогенами, в частности тестостероном, тогда как 5α -восстановленные андрогены этим качеством не обладают. Процесс дефеминизации у крыс опосредуется эстрогенными рецепторами после превращения тестостерона в эстра-

диол в клетках мозга. Маскулинизация является результатом не только ароматизации тестостерона, но и эффектов, опосредованных рецепторами эстрогенов и андрогенов.

Мозг неонатальных животных обладает ферментативной способностью к превращению тестостерона и андростендиона в эстрадиол и эстрон, а также образования 5 α -восстановленных андрогенов. Очищенные клеточные ядра целого мозга содержат 25 % ³H-эстрадиола и 10 % 5 α -дигидротестостерона, а гипоталамус, преоптическая и амигдолярная области также в ядерной фракции содержат приблизительно 50 % эстрадиола после введения ³H-тестостерона. Превращения тестостерона в эстрадиол в мозгу неонатальных животных подтверждено методом вытеснения связанных эстрогенных рецепторов, транслоцированных в клеточные ядра мозга. У самок крыс, получавших тестостерон в неонатальном периоде, ингибиторы ароматизации препятствовали дефеминизирующему его эффекту, а у самцов они препятствовали дефеминизирующему действию тестостерона. Важно отметить, что ингибитор ароматизации, блокируя дефеминизацию, не оказывает влияния на маскулинизацию. Самцы крыс в этом случае имеют столь же выраженное половое поведение, как и интактные животные.

В поддержку важной роли процесса ароматизации гормонов и эстрогенных рецепторов в дефеминизации мозга свидетельствует изучение андрогенинтенсивных мутаций. Эти животные характеризуются дефицитом андрогенных рецепторов и сниженной ответной реакцией к действию андрогенов. Самцы таких животных дефеминизированы, хотя этот процесс можно предотвратить путем кастрации на 2-й день постнатального развития. Рецепторы к эстрогенам и ароматизирующие способности мозговой ткани таких животных сохраняются на уровне интактных животных. Неонатальная кастрация мутационных самцов с дополнительной обработкой тестостероном и эстрадиолом способствует проявлению женского полового поведения и преовуляторному выделению лютеинизирующего гормона. Этот факт свидетельствует в пользу проявления действия ароматизирующих ферментов во многих структурах мозга, где имеются прогестинные рецепторы.

Данные литературы свидетельствуют о наличии эстрогенных и андрогенных рецепторов в гипоталамусе плодов крыс в последнем триместре беременности. Однако уровень рецепторов к эстрогенам у самцов и самок крыс значительно увеличивается к моменту рождения, тогда как уровень рецепторов к андрогенам заметно повышается только через одну неделю после рождения. По мере увеличения в пренатальном онтогенезе числа рецепторов к эстрогенам у самцов крыс они оккупируются эстрадиолом и транслоцируются в ядро. Этот процесс сохраняется и в постнатальный «критический период», причем начало этого «критического периода» определяется быстрым увеличением уровня эстрогенных рецепторов. В такой ситуации исследователей интересует вопрос о природе сигнала, который контролирует первое появление и

последующее перинатальное увеличение эстрогенных, прогестинных и андрогенных рецепторов, так же как и тестостерон-метаболизирующих энзимов в мозгу и у самок, и у самцов. Есть все основания полагать, что эстрогенные и прогестинные рецепторы развиваются независимо от уровня эндогенных стероидов, так как их развитие продолжается в гипоталамусе и после пересадки его в хориональную область овариэктомированным, адреналэктомированным или интактным самкам.

Следует отметить и еще одну важную деталь. Несмотря на то, что прогестинные рецепторы развиваются по типу эстрогенных рецепторов, их первоначальное увеличение задерживается на несколько дней. Появление повышенного количества рецепторов к эстрогенам в конце «критического периода» совпадает с созреванием некоторых компонентов лордозных ответов и процептивного поведения у неонатальных самок. Отмечается параллельное развитие рецепторов к эстрогенам и прогестинам как в коре, так и в гипоталамусе. К третьей неделе постнатального развития число рецепторов к эстрадиолу в коре заметно снижается, а к прогестинам сохраняется на том же уровне. Наличие прогестинных рецепторов в мозгу неонатальных крыс обеспечивает, с одной стороны, точку приложения для прогестерона, а с другой — снижает дефеминизирующее действие эстрадиола и тестостерона. На этом принципе и основано действие ципротерона ацетата, являющегося прогестогенным антиандрогеном.

Важная роль в эффекте эстрадиола на уровне рецепторов отводится α -фетопротейну (Raynaud et al., 1971). Этот белок связывает как эндогенный, так и экзогенный эстрадиол, но не связывает синтетические эстрогены, такие как моксэстрол, хотя он увеличивает чувствительность эстроген-рецепторных мест в мозгу к взаимодействию с эстрадиолом. Моксэстрол вызывает стимуляцию роста матки у неонатальных крыс и вызывает дефеминизацию этих животных при введении в небольших количествах. Белок α -фетопротейн обычно циркулирует в сыворотке крови, хотя обнаруживается и в нервной ткани. Некоторые виды α -фетопротейнов найдены и в цереброспинальной жидкости. Наличие α -фетопротейна в разных структурах мозга наводит на мысль о возможности выполнения им определенной функции в развитии мозга, кроме его защитной роли.

В последние годы исследователи обнаружили ростовой эффект половых гормонов, что является реальным прогрессом в понимании половой дифференцировки мозга. На основе нейроанатомических данных показано различие в типах синапсов преоптической области у взрослых крыс, которые были подвергнуты воздействию тестостерона в раннем постнатальном периоде (Raisman, Field, 1973). В дальнейшем были показаны различия в числе и размере клеток этой области мозга у особей разного пола и выявлена их эстрогенчувствительность. Введение эстрогенов неонатальным самкам крыс вызывает синаптогенный эффект в аркуатном ядре, который не наблюдается у половозрелых самок (McEwen, 1981).

Деафферентация медиобазального гипоталамуса, приводящая к частичной деградации пресинаптических элементов, восстанавливает способность эстрогенов стимулировать образование аксо-дендритных синапсов. Этот факт объясняет изменение поведения самцов крыс с септальными разрушениями после постоперативного введения эстрогенов (Nance et al., 1975).

Рассматривая вопросы гормональной рецепции в регуляции репродуктивных процессов, нельзя не коснуться «активационных» эффектов половых гормонов, т. е. их влияния на овуляцию, а также половое и агрессивное поведение. Если в отношении действия тестостерона ситуация более или менее ясна и известна — через превращение в эстрадиол он дефеминизирует крысиный мозг, подавляя его способность отвечать на эстрадиол и прогестерон в отношении овуляции и женского полового поведения, — то временные аспекты действия эстрадиола и прогестерона на вышеуказанные процессы представляют особый интерес.

Исследования последних лет привели к значительному прогрессу в расшифровке нейрофизиологических основ полового поведения. Комбинированное введение эстрадиола и прогестерона вызывает вначале изменение полового поведения, соответствующее таковому в эстральную фазу цикла, а затем через несколько часов меняется титр этих гормонов в крови. Увеличение эстрадиола следует за пиком прогестерона во второй половине проэструса и в дальнейшем сопровождается овуляторным выбросом лютеинизирующего гормона. Эстрадиол вызывает изменение женского полового поведения приблизительно через 18 ч, с максимумом через 24 ч. Прогестерон действует более быстро, меняя поведение в течение часа или даже быстрее. Оказалось, что действие эстрадиола и прогестерона на поведение проявляется через стимуляцию белкового синтеза. Ингибитор синтеза РНК актиномицин Д блокирует облегчающий эффект воздействия эстрадиола на процесс спаривания, так же как и блокаторы синтеза белка циклоксимид и анизомицин. Это подтверждается и временными интервалами действия анизомицина, которое предотвращает действие эстрадиола через 6-часовой интервал. Предполагается каскадный тип влияния эстрадиола в облегчающем воздействии его на лордозную реакцию, т. е. начальные процессы синтеза белка под влиянием эстрадиола готовят систему для его последующих процессов. Этим можно объяснить и проявление ранних и более поздних признаков активации полового поведения под влиянием стероидных гормонов. Анизомицин блокирует женское половое поведение, вызываемое прогестероном, значительно быстрее, чем эстрадиолом, в среднем приблизительно через час. Приведенные выше данные свидетельствуют в пользу того факта, что действие эстрадиола и прогестерона в нервной ткани осуществляется через прогестериновые рецепторы. В мозгу крыс индукция прогестериновых рецепторов в гипоталамусе и преоптической области по времени совпадает с активацией женского полового поведения. Показано также, что для проявления полового поведения необходим пороговый уровень индукции

прогестинных рецепторов, составляющий приблизительно 30 %. Описанные нами «организующие» эффекты половых гормонов затрагивают определенные нервные цепи, которые в дальнейшем могут быть более чувствительными в случае маскулинизации или менее чувствительными в случае дефеминизации к медиации для проявления особого поведения или реализации нейроэндокринных функций. Твердо установлено, что в основе проявления этих функций лежат процессы взаимодействия гормонов с рецепторами. Показано, например, что приобретение достаточного уровня гормональных рецепторов определенными нервными группировками ограничено в числе и происходит на определенном этапе развития, свидетельствующем о начале «критического периода». Более того, первичные эффекты тестостерона или эстрадиола в запуске роста невритов с учетом времени их воздействия объясняют возникновение синаптических связей и рост клеток, т. е. главную морфологическую особенность мозга в половых различиях. Не исключается также влияние гормонов на специфический нейротрансмиттерный фенотип, о чем свидетельствует тот факт, что глюкокортикоиды стимулируют развитие адренергических, а не холинергических медиаторов в развивающемся симпатическом нейроне.

В противоположность «организующему» действию гормонов «активационный» эффект половых стероидов на поведение реализуется путем модификации функционального состояния синаптических структур, включенных в нейротрансмиссию, вследствие чего меняется ответ нервной цепи на триггерный стимул, а также увеличивается образование нейросекреторного материала в эндоплазматическом ретикулуме, в частности в вентромедиальных ядрах, которые контролируют женское половое поведение. Под влиянием эстрогенов увеличивается чувствительность нейронов вентромедиальных ядер к входному афферентному стимулу и снижается чувствительность к ингибиторному нервному входу. Это приводит к активации группы клеток этих ядер, что оказывает влияние на мезенцефалон, который контролирует лордозную реакцию. В вентромедиальном ядре увеличивается число мускариновых холинергических рецепторов, действуя на которые медиаторы способствуют проявлению женского полового поведения. В данном случае снижается число серотониновых рецепторов, что ведет к уменьшению ингибиторного серотонинового эффекта, и это особенно важно в период максимального уровня эстрогенов в крови.

Описанные выше данные в отношении нейрохимической последовательности действия эстрогенов указывают на множественные регуляторные моменты, происходящие на уровне вентромедиального ядра, которые в конечном счете и обеспечивают проявление полового поведения. Необходимы дальнейшие исследования в изучении факторов, играющих главную роль в процессах становления нейроэндокринных механизмов, в расшифровке механизмов действия половых гормонов как в этом процессе, так и в изучении их роли в овуляторном выбросе гонадотропинов, а также сложных

форм полового поведения. В этом отношении весьма перспективным направлением исследований является анализ рецепторной системы гипоталамических структур в ходе онтогенеза, а также у взрослых особей, подвергнутых в первые дни после рождения кастрации или андрогенизации. Оказалось, что связывание эстрадиола в цитоплазматической фракции гипоталамуса не меняется в течение первых 5 дней постнатального развития и колеблется в пределах от 22.2 ± 1.1 до $24.4 \pm 6.1 \times 10^{-13}$ моль/мг белка, тогда как в ядерной фракции отмечено одинаковое связывание в 1-й и 3-й день (5.3 ± 0.6 и $5.4 \pm 1.4 \times 10^{-11}$ моль/мг ДНК) и незначительное увеличение числа связывающих эстрадиол мест на 5-й день жизни.

Константа ассоциации макромолекул гипоталамических клеток к гормонам достаточно высока как для цитоплазмы, так и для ядерной фракции. Можно отметить высокую емкость и высокое сродство связывания эстрадиола цитоплазмой гипоталамуса новорожденных крыс по сравнению с аналогичными показателями, обнаруженными у взрослых самок крыс, для которых характерна низкая связывающая емкость при высокой константе ассоциации.

Анализируя свойства эстрадиолсвязывающих белков, обнаруженных нами в цитозоле гипоталамуса 1-, 3- и 5-дневных крыс, можно отметить их большое сходство с рецепторными белками взрослых крыс, хотя по числу связывающих мест они более емки, чем рецепторы взрослых животных. Возможно, в цитозоле гипоталамуса неонатальных животных содержатся не только истинные рецепторы, но и эстрадиолсвязывающие места, идентичные α -фетопротеину.

Концентрация ядерных эстрадиолсвязывающих мест в гипоталамусе неонатальных самок крыс в 3—4 раза ниже, чем у половозрелых животных. Нами были выявлены ядерные рецепторы и в коре мозга, причем их концентрация снижалась к концу «критического периода». Было высказано предположение, что эти рецепторы наряду с гипоталамическими играют важную роль в половой дифференцировке мозга. Кроме того, эстрадиол, видимо, принимает участие в становлении функции коры, так как исчезновение рецепторов в коре головного мозга совпадает с периодом окончательной дифференцировки нейронов и прекращением роста и миелинизации нейритов.

Важно было проанализировать также изменение числа эстрадиолсвязывающих мест в мозге самцов крыс в период неонатального развития, так как процесс половой дифференцировки происходит у них под влиянием андрогенов, которые оказывают свое действие после превращения в эстрадиол в результате ароматизации.

Оказалось, что у самцов крыс обнаруживаются рецепторы к эстрадиолу в цитоплазматической фракции гипоталамуса, и самый высокий их уровень отмечен у 1-дневных животных ($43.3 \pm 2.1 \times 10^{-13}$ моль/мг белка). Затем концентрация рецепторов снижается к 3-му и далее к 5-му дню жизни. В ядерной фракции

гипоталамуса наблюдалась практически такая же динамика изменения концентрации эстрадиолсвязывающих мест, что и в цитоплазме.

У новорожденных самцов крыс динамика изменения числа тестостеронсвязывающих мест в гипоталамусе была аналогична той, которая характерна для рецепторов к эстрадиолу. При сопоставлении числа тестостеронсвязывающих мест в ядерной фракции гипоталамуса с концентрацией половых гормонов и ЛГ в крови прослеживается отрицательная корреляция.

При анализе характеристики рецепторов к половым гормонам гипоталамических структур у взрослых крыс, либо кастрированных, либо андрогенизированных в неонатальном возрасте, выявлены их значительные изменения. Оказалось, что связывание эстрадиола в цитоплазматической фракции преоптико-передней области гипоталамуса андрогенизированных самок не отличалось от такового аркуатной области и срединного возвышения (4.0 ± 0.8 и $3.5 \pm 0.7 \times 10^{-13}$ моль/мг белка), тогда как у интактных самок число связывающих мест в цитоплазме центра циклической регуляции гонадотропной функции гипофиза было в два раза выше, чем в области медиобазального гипоталамуса, т. е. в центре тонической регуляции (8.4 ± 0.9 и $3.7 \pm 0.5 \times 10^{-13}$ моль/мг белка). У самок крыс происходит двукратное снижение концентрации эстрогенных рецепторов в результате воздействия андрогенов. Связывание эстрадиола циторекцепторами гипоталамуса интактных и неонатально андрогенизированных самок характеризуется высоким сродством в пределах $0.8 - 1.3 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$.

Концентрации ядерных рецепторов к эстрадиолу в преоптической области и медиобазальном гипоталамусе интактных самок близки между собой (19.1 ± 2.1 и $20.5 \pm 1.9 \times 10^{-11}$ моль/мг ДНК). Андрогенизация снижает их число до неопределяемых величин.

Связывание эстрадиола цитоплазмой преоптической области интактных самцов было в 2 раза ниже, чем цитоплазмой аркуатного ядра и срединного возвышения (6.0 ± 0.5 и $10.3 \pm 1.7 \times 10^{-13}$ моль/мг белка). Кастрация самцов в неонатальном возрасте вызывала увеличение эстрогенных рецепторов в преоптической области в 1.5 раза по сравнению с медиобазальным гипоталамусом (9.6 ± 1.9 и $6.9 \pm 0.7 \times 10^{-13}$ моль/мг белка). Отсутствие гормонального фона у самцов вызывало значительное увеличение концентрации рецепторов в преоптической области и ее снижение в области аркуатных ядер — срединного возвышения, т. е. в областях гипоталамуса, ответственных за регуляцию гонадотропной функции гипофиза. Для циторекцепторов интактных и неонатально кастрированных самцов K_d находились в пределах $0.5 - 1.2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ и не отличались от K_d , характерной для рецепторов самок.

В ядерной фракции концентрация рецепторов к эстрадиолу у интактных самцов в обоих отделах гипоталамуса была одинаковой. У самцов, кастрированных в неонатальном возрасте, число ядерных эстрадиолсвязывающих мест в преоптической области было в 3 раза больше, чем в медиобазальном гипоталамусе.

Для ядерных рецепторов к эстрадиолу в гипоталамусе K_d рецепторов у самцов обеих групп колебалась в пределах от 0.9 до $2.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$ и не отличалась от таковой у интактных самок (Шишкина и др., 1983).

Обнаруженное нами снижение числа цитоплазматических рецепторов в преоптической области у неонатально андрогенизированных самок, по-видимому, связано со снижением их синтеза в перикарионах этой области гипоталамуса. Снижение биохимической активности нейронов, направленной на синтез рецепторов, возможно, происходит под влиянием андрогенов, которые, однако, не влияют на синтез циторекцепторов к эстрадиолу в аркуатном ядре и срединном возвышении.

Полученные нами данные свидетельствуют о нарушении механизма положительной обратной связи. У андрогенизированных животных центр циклической активности практически не функционирует, о чем свидетельствует отсутствие связывания эстрадиола ядерной фракцией преоптической области гипоталамуса, в то время как снижение числа ядерных рецепторов в области медиобазального гипоталамуса, возможно, является причиной нарушений у таких животных полового поведения.

В предыдущих разделах нами была показана ведущая роль андрогенов в регуляции первичных физиологических процессов, одним из которых является процесс половой дифференцировки как центральной нервной системы, так и половых органов. Важный вклад в расшифровку данной проблемы внесли данные о метаболизме тестостерона путем ароматизации и превращения его в эстрогены, хотя не исключается и непосредственное влияние тестостерона. Проведенные нами исследования по изучению концентрации тестостеронсвязывающих мест в цитоплазме преоптической области у интактных самцов крыс показали ее увеличение в два раза по сравнению с медиобазальным гипоталамусом (10.8 ± 1.1 и $5.0 \pm 0.6 \times 10^{-13}$ моль/мг белка соответственно). Число ядерных тестостеронсвязывающих мест в преоптической области было в 1,5 раза меньшим, чем в аркуатном ядре и срединном возвышении (4.3 ± 1.0 и $6.0 \pm 0.8 \times 10^{-11}$ моль/мг ДНК).

У неонатально кастрированных самцов в преоптической области не были обнаружены рецепторы к тестостерону ни в цитоплазме, ни в ядрах; в области аркуатного ядра — срединного возвышения — концентрация цитоплазматических рецепторов к тестостерону не отличалась от таковой у интактных животных (4.8 ± 0.4 и $5.0 \pm 0.6 \times 10^{-13}$ моль/мг белка), а в ядерной фракции число связывающих тестостерон мест было в два раза меньшим (3.0 ± 0.2 и $6.0 \pm 0.8 \times 10^{-11}$ моль/мг ДНК соответственно).

У половозрелых интактных самок мы не смогли обнаружить рецепторы к тестостерону ни в одной из исследуемых областей гипоталамуса. Только в результате неонатальной андрогенизации цитоплазматическая фракция медиобазального гипоталамуса приобретала способность к поглощению тестостерона, в ядерной же фракции отмечалась высокая концентрация рецепторов к тестосте-

рону в обеих областях. Характерным было то, что рецепторные белки обладали высоким сродством к тестостерону и высокой стереоспецифичностью.

Специфическое связывание тестостерона было обнаружено нами в гипоталамических нервных центрах у половозрелых интактных самцов крыс, причем в преоптической области концентрация цитоплазматических рецепторов к тестостерону была в 2 раза выше (а ядерных рецепторов — в 1.5 раза ниже), чем в аркуатном ядре и срединном возвышении.

Кастрация самцов в первые 3 дня после рождения приводит к снижению до неопределяемого уровня цитоплазматических и ядерных рецепторов к андрогенам в преоптической области, тогда как в медиобазальном гипоталамусе концентрация ядерных рецепторов снижалась в 2 раза, а число цитоплазматических эстрадиолсвязывающих мест не изменялось. Возможно, неонатальная кастрация самцов в «критический период» нарушает биохимическую основу процесса активации цитоплазматических рецепторов, вследствие чего снижается уровень ядерного связывания тестостерона у половозрелых самцов. Сопоставляя концентрацию рецепторных мест к тестостерону в гипоталамусе неонатально кастрированных самцов с уровнем тестостерона и ЛГ в крови, можно отметить наличие отрицательной обратной связи между этими показателями, которая проявляется на более низком уровне.

В своих исследованиях мы не обнаружили у интактных самок рецепторов к тестостерону ни в цитозольной, ни в ядерной фракциях. Андрогенизация самок в неонатальном периоде приводила к способности цитозольной фракции аркуатных ядер и срединного возвышения связывать тестостерон, причем концентрация цитоплазматических рецепторов к тестостерону не отличалась от числа связывающих мест в медиобазальном гипоталамусе интактных самцов крыс. И в ядерной фракции этой области концентрация рецепторов к тестостерону была такой же, как у интактных самцов. В преоптической области рецепторы к тестостерону в цитоплазме не обнаруживались, а в ядерной фракции их концентрация была значительно большей, чем у интактных самцов. Такой высокий уровень ядерного связывания тестостерона может вызывать ингибирование циклического центра регуляции у самок крыс и стимулировать у них мужское половое поведение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные литературы и собственные исследования подтверждают идею о том, что половые гормоны непосредственно принимают участие в гипоталамической регуляции секреции гонадотропинов по принципу обратной связи. Показано, что воздействуют они посредством специфических рецепторов, как цитоплазматических, так и ядерных, локализованных в гипоталамических структурах. Важно также отметить, что рецепторно-опо-

средованный механизм действия гормонов существует наряду с их непосредственным влиянием на нейроны центральной нервной системы через классические нейромедиаторы, в основном через моноамины.

Л и т е р а т у р а

- Бабичев В. Н. Нейроэндокринология пола. М.: Наука, 1981. 224 с.
- Бабичев В. Н. Нейрогормональная регуляция овариального цикла. М.: Медицина, 1984. 240 с.
- Бабичев В. Н., Адамская Е. И. Изменение содержания моноаминов в различных областях гипоталамуса в зависимости от стадии эстрального цикла. — Пробл. эндокринолог., 1976, т. 22, № 4, с. 44—49.
- Бабичев В. Н., Перышкова Т. А., Озоль Л. Ю. Внутриклеточное распределение эстрадиолсвязывающих мест в гипоталамусе самок крыс в ходе эстрального цикла. — Пробл. эндокринолог., 1983, т. 29, № 6, с. 46—51.
- Баранов В. Г., Данилова О. А., Пройма Ф. И. и др. Влияние уровня моноаминов на содержание гонадотропин-рилизинг гормона в гипоталамусе, гонадотропную функцию гипофиза, овуляторную и гормональную функцию яичников. — Физиол. журн. СССР, 1977, т. 63, № 10, с. 1411—1416.
- Баранов В. Г., Поленов А. Л., Пропп М. В. и др. ЛГ-рилизинг-активность различных отделов гипоталамуса крыс по стадиям эстрального цикла и после овариэктомии. — Физиол. журн. СССР, 1971, т. 22, № 4, с. 44—49.
- Резников А. Г. Половые гормоны и дифференциация мозга. Киев: Наукова думка, 1982. 252 с.
- Розен В. Б., Смирнов А. Н. Рецепторы и стероидные гормоны. М.: Изд-во МГУ, 1981. 310 с.
- Шпшкина И. В., Озоль Л. Ю., Бабичев В. Н. Цитоплазматические и ядерные рецепторы к тестостерону в гипоталамусе у андрогенизированных самок и кастрированных самцов крыс. — Пробл. эндокринолог., 1983, т. 29, № 5, с. 44—48.
- Юдаев Н. А., Асрибекова М. К., Каганович Б. Е. Рецепция половых гормонов в эндометрии человека при нормальной и патологической беременности. — Пробл. эндокринолог., 1976, т. 22, № 2, с. 36—39.
- Advis J., McCann S., Negro-Vilar A. Evidence that catecholaminergic and peptidergic (LH-RH) neurons in suprachiasmatic-medial preoptic, medial basal hypothalamus and median eminence are involved in estrogen-negative feedback. — Endocrinology, 1980, vol. 107, p. 892—901.
- Anderson J., Peck E., Clark J. Estrogen-induced uterine responses and growth: relationship to receptor estrogen binding by uterine nuclei. — Endocrinology, 1975, vol. 96, p. 160—167.
- Attardi B., Geller L., Ohno S. Androgen and estrogen receptor in brain cytosol from male, female and testicular feminized mice. — Endocrinology, 1976, vol. 98, p. 864—874.
- Biegon A., Bercovitz H., Samuel D. Serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. — Brain Res., 1980, vol. 187, p. 221—225.
- Biegon A., Reches A., Snyder L., McEwen B. Serotonergic and noradrenergic receptors in the rat brain. Modulation by chronic exposure to ovarian hormones. — Life Sci., 1983, vol. 32, p. 2015—2021.
- Chowers I., McCann S. Content of luteinizing hormone releasing factor and luteinizing hormone during the, estrous cycle and after changes in gonadal steroid titers. — Endocrinology, 1965, vol. 76, p. 700—708.
- Cidlowski Y., Muldoon T. Estrogenic regulation of cytoplasmic receptor populations in estrogen-responsive tissues of the rat. — Endocrinology, 1974, vol. 95, p. 1621—1629.
- Domanski E., Przekop F., Polkowska J. Hypothalamic centres involved in the control of gonadotropin secretion. — J. Reprod. and Fertil., 1980, vol. 58, p. 493—499.

- Drouva S., Laplante E., Gautron J., Kordon C. Effects of 17β -estradiol on LH-RH release from rat mediobasal hypothalamic slices. — *Neuroendocrinology*, 1984, vol. 38, p. 152–157.
- Dyer R., Mansfield S., Yates J. Discharge of gonadotropin-releasing hormone from the mediobasal part of the hypothalamus: effects of stimulation frequency and gonadal steroids. — *Exp. Brain Res.*, 1980, vol. 39, p. 453–460.
- Eisenfeld J., Axelrod J. Effect of steroid hormones, ovariectomy, estrogen pretreatment, sex and immaturity on the distribution of ^3H -estradiol. — *J. Endocrinol.*, 1966, vol. 79, p. 38–42.
- Fink G., Jamieson M. Immunoreactive luteinizing hormone releasing factor in rat pituitary stalk blood: effects of electrical stimulation of the medial preoptic area. — *J. Endocrinol.*, 1976, vol. 68, p. 71–87.
- Fishman J. Biological action of catecholestrogens. — *J. Endocrinol.*, 1981, vol. 89, p. 59–65.
- Ginsburg M., MacLusky N., Morris I., Thomas P. Cyclic fluctuation of oestradiol receptors in hypothalamus and pituitary. — *J. Physiol. (Gr. Brit.)*, 1972, vol. 224, p. 72–74.
- Ginsburg M., MacLusky N., Morris I., Thomas P. Physiological variation in abundance of oestradiol specific high affinity binding sites in hypothalamus, pituitary and uterus of the rat. — *J. Endocrinol.*, 1975, vol. 64, p. 443–449.
- Goodman R. The site of the positive feedback action of estradiol in the rat. — *Endocrinology*, 1978, vol. 102, p. 151–159.
- Greely G., Muldoon T., Allen M., Mahesh V. Pituitary sensitivity to LRF and estradiol- 17β receptor population during the rat estrous cycle. — *J. Steroid Biochem.*, 1974, vol. 5, p. 388.
- Greely G., Muldoon T., Mahesh V. Correlative aspects of luteinizing hormone-releasing hormone sensitivity and cytoplasmic estrogen receptor concentration in the anterior pituitary and hypothalamus of the cycling rat. — *Biol. Reprod.*, 1975, vol. 13, p. 505–512.
- Jensen E., Jacobson H. Basic guides to the mechanism of estrogen action. — In: *Recent progress in hormone research*. N. Y.; London; Acad. Press, 1962, vol. 18, p. 387–414.
- Kalra P., Kalra S. Temporal changes in the hypothalamic and serum luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) levels and the circulating ovarian steroids during the rat estrous cycle. — *Acta endocrinol.*, 1977, vol. 85, p. 449–455.
- Kalra P., Kalra S. Modulation of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone levels by intracranial and subcutaneous implants of gonadal steroids in castrated rats: effects of androgen and estrogen antagonists. — *Endocrinology*, 1980, vol. 106, p. 390–397.
- Kalra S. Circadian rhythm in luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH) content of preoptic area during the rat estrous cycle. — *Brain Res.*, 1976, vol. 104, p. 354–358.
- Kalra S., Kalra P. Dynamic changes in hypothalamic LH-RH level associated with the ovarian steroid-induced gonadotropin surge. — *Acta endocrinol.*, 1979, vol. 92, p. 1–7.
- Kalra S., Kalra P., Mitchell E. Differential response of luteinizing hormone-releasing hormone in the basal hypothalamus and the preoptic area following anterior hypothalamic deafferentation and / or castration in male rats. — *Endocrinology*, 1977, vol. 100, p. 201–204.
- Kato J. In vitro uptake of tritiated oestradiol by the rat anterior hypothalamus during the oestrous cycle. — *Acta endocrinol.*, 1970, vol. 63, p. 577–584.
- Kato J. Sex hormone receptors in the hypothalamus and hypophysis. — In: *Endocrinology of sex*. Leipzig: Barth, 1974, p. 202–230.
- Kato J. Steroid hormone receptors in brain, hypothalamus and hypophysis. — In: *Receptors and mechanism of action of steroid hormones*. N. Y.; Basel, 1977, pt. 2, p. 603–672.
- Kato J., Villet C. Preferential uptake of estradiol by the anterior hypothalamus of the rat. — *Endocrinology*, 1967, vol. 80, p. 567–575.
- Katzenellenbogen B., Gorski J. Estrogen action in vitro. Induction of the synthesis of a specific uterine protein. — *J. Biol. Chem.*, 1972, vol. 247, p. 1299–1305.

- Kelner K., Miller A., Peck E. Estrogens and the hypothalamus: nuclear receptor and RNA polymerase activation. — *J. Receptor Res.*, 1980, vol. 1, p. 215–237.
- Kirchhoff J., Hornung E., Ghraf R. et al. Interactions of catecholestrogens with cytoplasmic and nuclear estrogen receptors in rat pituitary gland and hypothalamus. — *J. Neurochem.*, 1981, vol. 37, p. 1540–1547.
- Luine V., Nottebohm F., Harding C., McEwen B. Androgen affects cholinergic enzymes in syringeal motor neurons and muscle. — *Brain Res.*, 1980, vol. 192, p. 89–107.
- McEwen B., Pfaff D. Factors influencing steroid hormone uptake by rat brain regions. I. Effects of neonatal treatment, hypophysectomy and competing steroids in oestradiol uptake. — *Brain Res.*, 1970, vol. 21, p. 1–16.
- McEwen B., Krey L., Luine V. Steroid hormone action in the neuroendocrine system: when is the genome involved? — In: *The Hypothalamus*. N. Y.; Raven Press, 1978, p. 255–268.
- McEwen B., Biegon A., Rainbow T. et al. Steroid hormone regulation of the brain. Oxford: Pergamon Press, 1981, p. 15–30.
- McEwen B., Biegon A., Davis P. et al. Steroid hormones: humoral signals which alter brain cell properties and functions. — In: *Recent progress in hormone research*. N. Y.; London: Acad. Press., 1982, vol. 38, p. 41–92.
- Menon K., Gunaga K. Cytoplasmic and nuclear receptors. Estradiol complex in the hypothalamus and pituitary: relationship with pituitary sensitivity to gonadotropin releasing hormone and gonadotropin secretion in the rat. — *Neuroendocrinology*, 1976, vol. 22, p. 8–17.
- Milgrom E., Atger M., Baulieu E. Studies on estrogen entry into uterine cells and on estrogen-receptors complex attachment to the nucleus is the entry of estrogen into uterine cells a protein-mediated process? — *Biochim. et biophys. acta*, 1973, vol. 320, p. 267–283.
- Muldoon T., Cidlowski J., Korach K. Control of estrogen receptors in male and female rat anterior pituitary and hypothalamus. — *J. Steroid Biochem.*, 1974, vol. 5, p. 392.
- Naess O., Attramadal A., Hansan V. et al. Androgen receptors in the cytosol fractions of the anterior pituitary gland, hypothalamus, preoptic area and brain cortex of the rat. — *J. Steroid Biochem.*, 1974, vol. 5, p. 391.
- Haftolin F., Ryan K., Davies L. et al. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. — In: *Recent progress in hormone research*. N. Y.; London: Acad. Press, 1975, vol. 31, p. 295–319.
- Nance D., Shryne J., Gorski R. Facilitation of female sexual behavior in male rats by septal lesions: an interaction with estrogen. — *Hormones and Behav.*, 1975, vol. 6, p. 289–299.
- Nottenbohm F. *Progress in psychobiology and physiological psychology*. N. Y.: Acad. Press, 1980, p. 85–124.
- Parsons B., Rainbow T., Pfaff D., McEwen B. Oestradiol, sexual receptivity and cytosol progesterin receptors in rat hypothalamus. — *Nature*, 1981, vol. 292, N 5818, p. 58–59.
- Rainbow T., Parsons B., McEwen B. Sex differences in rat brain oestrogen and progesterin receptors. — *Nature*, 1982, vol. 300, N 5893, p. 648–649.
- Raisman G., Field P. Sexual dimorphism in the neuropil of the preoptic area of the rat and its dependence on neonatal androgen. — *Brain Res.*, 1973, vol. 54, p. 1–29.
- Raynaud J., Mercier-Bodard C., Baulieu E. Rat estradiol binding plasma protein. — *Steroids*, 1971, vol. 18, p. 767–788.
- Roy E., Wilson M. Diurnal rhythm of cytoplasmic estrogen receptors in the rat brain in the absence of circulating estrogens. — *Science*, 1981, vol. 213, N 4515, p. 1525–1527.
- Sen K., Menon K. Oestradiol receptors in the rat anterior pituitary gland during the oestrous cycle: quantitation releasing hormonemediated luteinizing hormone release. — *J. Endocrinol.*, 1978, vol. 76, p. 211–218.
- Scheridan P. The nucleus interstitialis streae terminalis and the nucleus amygdaloides medialis: prime target for androgen in the rat forebrain. — *Endocrinology*, 1979, vol. 104, p. 130–136.

- Stumpf W., Sar M. Steroid hormone target sites in the brain: the differential distribution of estrogen, progestin, androgen and glucocorticosteroids. — *J. Steroid Biochem.*, 1976, vol. 17, p. 1163—1170.
- Takahashi M., Saito A. Changes concentration of hypothalamic cytosolic progestin receptors at the initiation of pseudopregnancy in rats. — *Endocrinol. jap.*, 1983, vol. 30, p. 381—387.
- Tytell M., Clark J., Peck E. Effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone in a hypothalamic synaptosomal fraction from the ovariectomized rat. — *Endocrinol. Res. Commun.*, 1980, vol. 7, p. 27—44.
- Vertes M., Gocze P., Varga P., Kovacs S. Studies on hypothalamic estradiol binding during estrous cycle and after ovariectomy. — *Endocrinol. Exp.*, 1977, vol. 11, p. 227—234.
- White O., Thrower S., Lim L. Intracellular relationships of the oestrogen receptor in the rat uterus and hypothalamus during the oestrus cycle. — *Biochem. J.*, 1978, vol. 172, p. 37—47.

Глава 4

РЕЦЕПЦИЯ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ МАТКОЙ

СВОЙСТВА РЕЦЕПТОРОВ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ

Согласно концепции Дженсена, женские половые гормоны, как и все стероиды, осуществляют свое влияние на органы-мишени путем высокоаффинного и избирательного взаимодействия с внутриклеточными белками-рецепторами, которые первично локализованы в цитоплазме клеток. Здесь образовавшийся гормон-рецепторный комплекс активируется и затем транслоцируется в ядро клетки, где и вызывает избирательную экспрессию генома. Суть активации заключается в структурно-функциональных перестройках гормон-рецепторного комплекса, в результате которых приобретает дополнительное сродство к акцепторным местам на хроматине. Непосредственным результатом взаимодействия этого комплекса с акцепторными местами на хроматине является инициация синтеза ряда м-РНК с последующей их трансляцией в специфические белки, формирующие фенотипический ответ органа-мишени на гормональное воздействие.

Цитозольная фракция, получаемая из матки млекопитающих, содержит белок-рецептор для эстрогенов с K_d для эстрадиола в пределах $10^9 - 10^{10} \text{ M}^{-1}$ и ограниченным числом связывающих мест, приблизительно 500—30 000 на клетку (Segal, Koide, 1981; Сергеев, 1984). Взаимодействие эстрадиола с рецепторами ткани матки осуществляется за счет сильных нековалентных связей. Значение величин K_a для рецепторов в $10^3 - 10^5$ раз больше аналогичных величин, характеризующих связывание эстрадиола с сывороточным альбумином, благодаря чему гормон поступает из крови в клетку против градиента концентрации. Относительное связывающее сродство цитозоля матки для различных эстрогенов убывает в следующем порядке: 17β -эстрадиол, эстрон, эстриол, 17α -эстрадиол.

Рецептор эстрадиола ткани матки млекопитающих представляет собой умеренно кислый крупномолекулярный белок с изоэлектрической точкой 6.2—6.6. Молекула имеет сложную четвер-

тичную структуру и состоит из 2—4 субъединиц. В условиях низкой ионной силы цитозольный рецептор эстрадиола имеет коэффициент седиментации 8.6—9.0 S с молекулярной массой примерно 230—250 кД. При повышении ионной силы раствора коэффициент седиментации рецепторов снижается до 4.0—4.5 S, что соответствует молекулярной массе 60—75 кД. Это отражает процесс обратимой диссоциации рецептора на гормонсвязывающие субъединицы, причем указанные изменения размеров молекул рецепторного белка, по-видимому, не зависят от присутствия гормона (Schrader et al., 1980; Segal, Koide, 1981).

Отличительной особенностью рецепторов эстрадиола в матке является образование из нативной 8.6 S его формы промежуточного соединения с коэффициентом седиментации около 4.5 S и молекулярной массой приблизительно 110 кД, обнаруживаемой в цитоплазме и ядре (Розен, Смирнов, 1981). В свою очередь 4.5 S рецептор может обратимо трансформироваться в 5 S форму под влиянием Ca^{2+} -зависимого фактора. Важность образования 5 S формы рецептора эстрадиола заключается в том, что оно сопровождается активацией, т. е. появлением дополнительного сродства к акцепторным местам на хроматине. Кинетический анализ процесса трансформации показал, что превращение рецептора в 5 S форму является бимолекулярной реакцией между 4 S эстрогенсвязывающей субъединицей и вторым белковым компонентом, получившим название фактора активации. Этот фактор сам не связывает эстроген и присутствует приблизительно в той же концентрации, что и 4 S субъединица. Роль этой трансформированной формы рецепторов эстрадиола и связанных с ней факторов постоянно обсуждается в литературе. В частности, приводятся данные о близком сходстве белкового фактора активации с факторами, стимулирующими РНК-полимеразную активность в эукариотических клетках, а также с внутриклеточным акцептором для рецепторов эстрадиола. Предполагается, что функция рецепторов заключается в переносе этого фактора в ядро, где он способен стимулировать транскрипцию генома (Thampan, Clark, 1981). Однако, несмотря на ряд экспериментальных фактов, подтверждающих наличие этой формы структурного превращения молекулы рецепторов, многие авторы подвергают сомнению ее функциональное значение (Розен, Смирнов, 1981).

Прогестероновый рецептор представляет собой крупный, умеренно кислый белок с изоэлектрической точкой 4.8—7.2, имеющий сложную четвертичную структуру.

На яйцеводах цыплят, классической модели для изучения прогестероновых рецепторов, показано, что активированная форма рецептора образована двумя субъединицами, А и В, с молекулярной массой соответственно 79 и 106 кД. Согласно одной из гипотез (Schrader, O'Malley, 1978), субъединичная структура молекул рецептора прогестерона является необходимым условием выполнения рецепторами своих внутриклеточных функций. Исходной формой прогестеронового рецептора является димер 6—8 S,

состоящий из двух прогестеронсвязывающих субъединиц 4 S. Димер приобретает способность ассоциироваться с ядром лишь после связывания гормона. Взаимодействие рецепторной молекулы с ядром клетки включает два этапа. На первом этапе за счет субъединицы В происходит связывание с акцепторными местами на хроматине, что приводит к диссоциации димера и освобождению субъединицы А, обеспечивающей второй уровень узнавания путем высокоспецифического избирательного взаимодействия с ДНК. Последнее приводит к дестабилизации спиральной структуры соответствующих участков ДНК, их разворачиванию, и это служит началом усиленного синтеза РНК.

Авторы предполагают, что эта схема приемлема и для других рецепторов, в том числе и эстрогенов, однако она не дает молекулярного объяснения процессам активации гормон-рецепторного комплекса, а сводит их к более простой проблеме образования и распада субъединичных ансамблей.

РЕГУЛЯЦИЯ УРОВНЯ РЕЦЕПТОРОВ ПОЛОВЫХ ГОРМОНОВ В МАТКЕ

Различают гомоспецифическую регуляцию рецепторов собственными гормонами и гетероспецифическую регуляцию, при которой уровень рецепции для одного гормона определяется влиянием преимущественно одного или нескольких гетерологичных гормонов.

При гомоспецифической регуляции после введения физиологических доз этих гормонов в клетках матки начинаются процессы инактивации, реактивации и биосинтеза рецепторных молекул, которые выражаются закономерными изменениями рецепторного связывания. После однократного введения эстрогенов и прогестинов через 1—3 ч наблюдается транслокация гормон-рецепторных комплексов в ядро и падение общего содержания рецепторов в клетке — процесс, получивший название фазы элиминации. Считается, что элиминация рецепторов происходит из-за их деградации и инактивации. Затем, через 18—24 ч, следует фаза регенерации общего содержания рецепторов в клетке, включающая реактивацию и синтез рецепторных молекул *de novo*.

Различия в ходе процессов элиминации рецепторов эстрогенов и прогестерона касаются лишь временных и количественных параметров, тогда как регенерация рецепторов этих стероидов характеризуется существенными отличиями. Количество рецепторов эстрогенов после введения эстрадиола через 24 ч не только восстанавливается, но в 1.5—2 раза превышает исходный уровень. После введения прогестерона через 24—72 ч содержание его рецепторов в цитозоле не восстанавливается. Можно заключить, что эстрогены способны индуцировать синтез собственных рецепторов, а прогестины таким свойством не обладают. Однако в отдельных работах указывается, что прогестерон также способен вызвать кратковременную проходящую индукцию собственных рецепторов после однократного введения гормона (Walters, Clark, 1978). В то же

время оба половых стероида осуществляют транслокацию своих рецепторов в ядра клеток матки.

В настоящее время это представление господствует в литературе и позволяет успешно объяснить динамику рецепторных процессов в некоторых физиологических ситуациях. Однако ряд фактов заставляет дополнить уже сложившуюся схему. Эти факты получены в экспериментах с многократным введением половых стероидов овариэктомированным, а также интактным животным.

Надо отметить, что такая постановка эксперимента является необходимой, так как хроническое введение гормона более адекватно моделирует физиологическое состояние организма, поскольку гормональные воздействия половых стероидов продолжаются, как правило, достаточно длительно.

В наших опытах проводилось исследование хронического введения эстрадиола и прогестерона на содержание рецепторов этих гормонов в матке у крыс. Как видно из диаграммы (рис. 1), многократное введение эстрадиола в физиологических (1 мкг) и фармакологических (10 мкг) дозах приводит к достоверному снижению рецепторного связывания эстрадиола цитозольной и ядерной фракциями ткани матки у взрослых циклирующих крыс.

Таким образом, в отличие от стимулирующего эффекта однократного введения эстрадиола на фоне хронического воздействия гормона реализуется ингибирующее влияние на циторцепцию эстрадиола в матке. Ингибирующее действие эстрадиола на синтез собственных рецепторов в цитозоле и на транслокацию их в ядро может реализоваться в физиологических условиях в процессе терминации гормонального эффекта эстрогенов.

Хроническое введение прогестерона, по данным литературы, также подавляет синтез собственных рецепторов (Boomsa et al., 1982). В наших опытах был исследован эффект хронического введения прогестерона в течение 7 дней в дозе 0.1 мг овариэктомированным самкам крыс репродуктивного возраста на содержание свободных и занятых эндогенным гормоном рецепторов прогестерона в цитозоле. Через 24 ч после последнего введения прогестерона наблюдается значительное увеличение ядерной формы прогестероновых рецепторов.

В культуре эндометрия женщин при беременности отмечено увеличение количества рецепторов прогестерона при введении этого гормона в инкубационную среду (Юдаев и др., 1979). Возможно, обнаруженный способ регуляции прогестероном своих собственных рецепторов играет наиболее существенную роль именно при беременности, когда осуществляется длительное и преимущественное влияние прогестерона.

Итак, краткосрочное воздействие эстрадиола на организм приводит к увеличению синтеза собственных рецепторов, при продолжающихся воздействиях синтез рецепторов эстрадиола в цитоплазме ингибируется. Прогестерон, напротив, подавляет синтез собственных рецепторов при кратковременном воздействии,

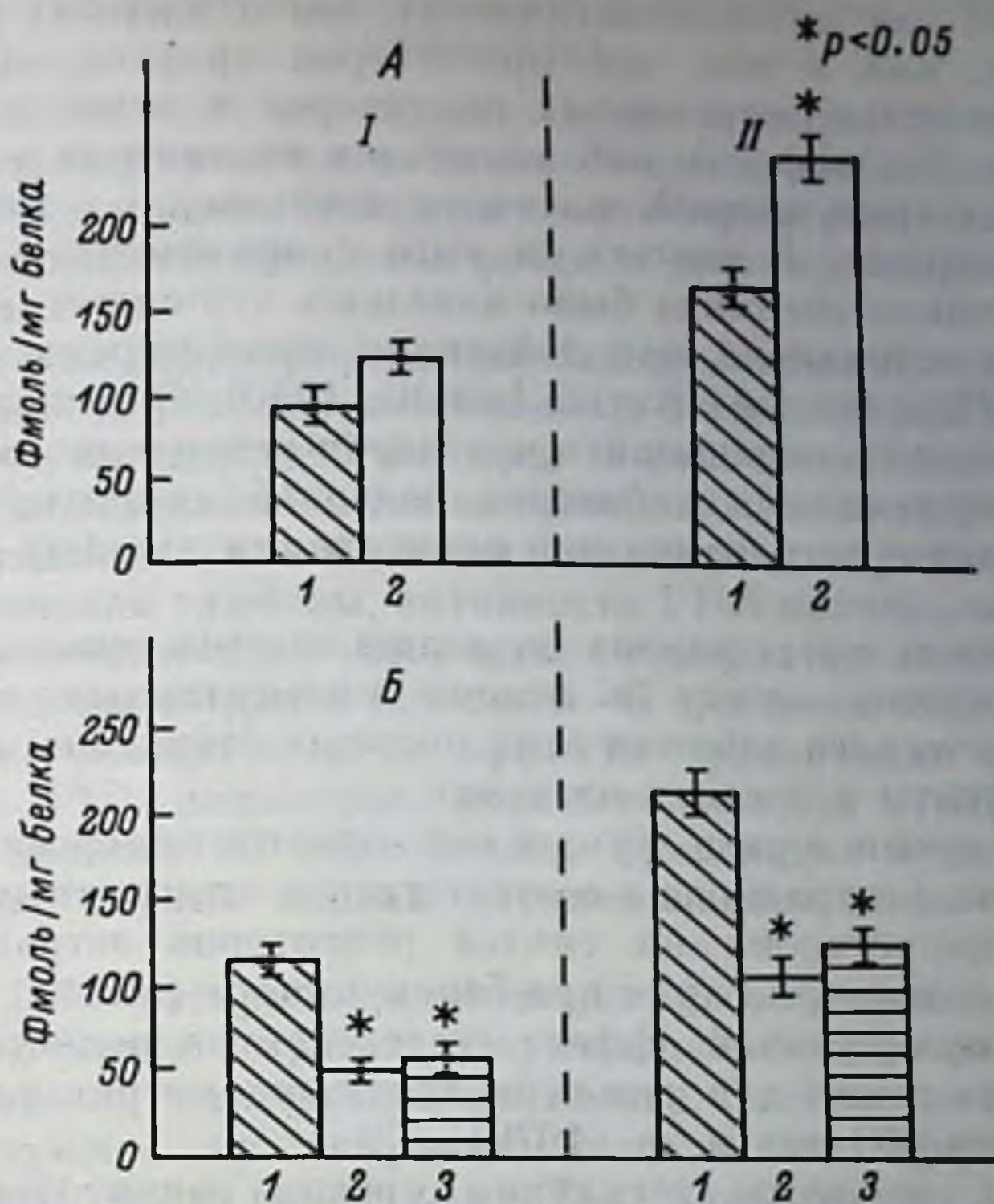


Рис. 1. Влияние однократного (А) и многократного (Б) введения эстрадиола на содержание ядерных (I) и цитозольных (II) рецепторов эстрадиола в матке крыс. 1 — контрольные животные, 2 — введение 2 мкг эстрадиола, 3 — введение 10 мкг эстрадиола. * — различия достоверны ($p < 0.001$).

но при определенных длительных влияниях на матку приводит к увеличению их содержания.

Гетероспецифическая регуляция рецепции эстрогенов и прогестерона определяется прежде всего их взаимным влиянием на соответствующие гетерологичные рецепторы. Давно установлено, что эстрогены способны сенсibiliзировать органы репродуктивной системы самок к действию прогестерона. Согласно современным представлениям, это обусловлено способностью эстрогенов индуцировать синтез рецепторов прогестерона в клетках-мишенях, увеличивая концентрацию последних в 2—15 раз. Актиномицин Д и циклогексемид полностью подавляют эффект эстрадиола и его аналогов, и это позволяет заключить, что в основе данного действия эстрогенов лежит индукция синтеза рецепторных белков. Стимуляция синтеза рецепторов прогестерона является неотъемлемым свойством эстрадиола, которое ярко проявляется при любой постановке экспериментов (Manni et al., 1981).

В свою очередь прогестерон оказывает влияние на рецепторы эстрогенов. В большинстве случаев оно выражается в снижении

содержания как цитоплазматических, так и ядерных рецепторов эстрадиола, или в том, что прогестерон предотвращает увеличение количества эстрогенных рецепторов в ответ на введение эстрадиола. Эти эффекты наблюдаются в эндометрии у овариэктомированных крыс, мышей, хомячков, в яйцеводах и матке кошек, у овец, кроликов. В опытах *in vitro* с применением актиномицина Д и циклогексемида было показано, что снижение ядерных рецепторов эстрадиола под действием прогестерона зависит от синтеза РНК и белков (Evans, Leavitt, 1980). Очевидно, этот эффект включает транслокацию прогестерон-рецепторного комплекса в ядро и индукцию ингибиторов белковой природы. В результате происходит деградация или инактивация ядерных рецепторов эстрогенов.

Способность прогестерона подавлять синтез рецепторов эстрадиола, вероятно, лежит в основе молекулярных механизмов антагонистического влияния этих половых стероидов на биологические эффекты в органах-мишенях.

В то же время в ряде случаев наблюдается синергизм действия прогестерона и эстрадиола и соответственно этому стимулирующее действие прогестерона на синтез рецепторов эстрадиола. Это отмечено в эндометрии крыс при беременности (Martel, Psychoyos, 1982). Стимулирующий эффект гестагенов на рецепторы эстрадиола описан также для культуры ткани эндометрия женщины при беременности (Юдаев и др., 1979).

Конечно, процессы регуляции уровня рецепторов половых стероидов в матке не ограничиваются взаимными влияниями эстрогенов и прогестерона на индукцию и репрессию собственных рецепторов, хотя они и являются определяющими. В формировании реакции матки на эстрадиол, возможно, принимают участие гипофизарные гормоны (пролактин, гормон роста), так как гипофизэктомия снижает его эффекты на содержание рецепторов. Показано, что эпифизарный фактор аргинин-вазотоцин подавляет связывание эстрадиола с рецепторами в опытах *in vitro* (Vaughan et al., 1979). На децидуальной ткани женщины при беременности проявляются эффекты простагландина $F_{2\alpha}$, увеличивающего содержание рецепторов эстрадиола и прогестерона в этой ткани. Повышение уровня рецепторов эстрадиола *in vitro* под влиянием простагландинов не ингибируется пурамицином и актиномицином Д и, следовательно, не является следствием биосинтеза, но, видимо, связано с активацией рецепторного белка (Юдаев и др., 1980).

Кроме того, существует запасной, аварийный способ регуляции клеточного метаболизма, осуществляемый, разумеется, в весьма ограниченных пределах, когда рецептор транслоцируется в ядро и регулирует транскрипцию без гормона, как это показано на матке адренал- и овариэктомированных свиней (Jungblut et al., 1978).

РЕЦЕПЦИЯ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ И ИХ МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ

В репродуктивный период онтогенеза основное биологическое действие эстрадиола во время полового цикла направлено на подготовку оплодотворения и первых этапов беременности. Это достигается стимуляцией процессов роста и дифференцировки матки и яйцеводов.

В опытах на овариэктомированных животных прослежена последовательность реакций, вовлекаемых в эти специфические анаболические превращения. Уже через 15 мин. после введения эстрадиола в матке развиваются так называемые ранние эффекты эстрогенов. Они заключаются в увеличении скорости кровотока, возрастании окисления глюкозы, активности РНК-полимеразы II типа, цАМФ, увеличении сырого веса органа в результате задержки воды. Эти процессы нарастают в течение 6—8 ч, а затем через 24—48 ч, наблюдаются более поздние эффекты: увеличение активности всех видов РНК-полимераз, усиление синтеза ДНК и белка, клеточное деление. В этот период происходит истинный рост матки, а на первых этапах осуществляется лишь подготовка к нему.

В ряде работ раскрыто значение рецепторного звена в реализации этих эффектов эстрогенов, причем доказана решающая роль ядерного гормон-рецепторного комплекса. Количество ядерных рецепторов, нужное для стимуляции тех или иных эффектов эстрогенов, может быть различным. Так, значительное увеличение окисления глюкозы в матке неполовозрелых крыс достигается без заметного возрастания количества ядерных рецепторов. В то же время между степенью водной имбибиции и количеством ядерных гормон-рецепторных комплексов наблюдается высокая положительная корреляция (Anderson et al., 1973). Однако некоторые авторы связывают водную имбибицию, увеличение сосудистой проницаемости, выход гистамина не с рецепторами эстрадиола в клетках матки, а с его рецепцией в эозинофилах. Проникновение эозинофильных лейкоцитов в матку из сосудистого русла при действии эстрогенов возрастает параллельно с увеличением водной имбибиции (Tchernitchin, Galand, 1983). При этом процессы, опосредованные увеличением эозинофилии в матке они относят к негеномным эффектам эстрогенов, тогда как увеличение содержания РНК, белка, ферментов, морфологическая и функциональная дифференцировка в матке происходят с участием эстрогеновых рецепторов в клетках самого эндометрия и миометрия и являются геномными. Условность такой классификации убедительно демонстрируется тем, что обводнение матки ингибируется актиномицином Д и, следовательно, сопровождается активацией генетического аппарата.

Еще одна группа эффектов опосредуется через увеличение цАМФ. Примером таких эффектов служит стимуляция синтеза гликогена.

Если «ранние» ответы на введение эстрогенов определяются главным образом транслокацией гормон-рецепторного комплекса в ядро, то более поздние эффекты, приводящие к увеличению сухого веса матки через 24—72 ч, зависят от временных параметров взаимодействия этого комплекса с хроматином в ядрах. Так, введение эстриола и эстрадиола вызывает одинаковую аккумуляцию эстрогеновых рецепторов в ядрах клеток матки крыс и стимуляцию «ранних» ответов через 1—3 ч. Вместе с тем через 6 ч уровень эстрадиол-рецепторного комплекса в ядрах остается высоким, а эстриол-рецепторного — снижается до контрольных величин. Связывая с этим отсутствие возрастания сухого веса матки через 24 ч после введения эстриола, исследователи приходят к заключению, что для истинного роста матки необходимо длительное, не менее 6 ч, пребывание гормон-рецепторного комплекса в ядре. Таким образом, первичные ответы на эстрогены, обеспечивая накопление субстратов и энергии, а также стимулируя транспорт этих субстратов и мембранные процессы, необходимы для развивающихся в более поздние сроки истинных утеротропных реакций синтеза ДНК, белка и клеточного деления. Однако проявление истинного роста наблюдается лишь при определенной длительности взаимодействия эстроген-рецепторного комплекса с акцепторными местами на хроматине (Anderson et al., 1975).

Данное условие не является единственно необходимым для развития эффекта эстрогенов. Это иллюстрируют работы с применением различных нестероидных антиэстрогенов. В настоящее время довольно большая группа таких веществ усиленно используется не только в клинике, но и в теоретических исследованиях механизмов действия эстрогенных гормонов. Конкурируя с эндогенными эстрогенами за связывание с рецепторами в тканях-мишенях, антиэстрогены не оказывают свойственного этим гормонам метаболического и ростового действия, а в некоторых отношениях они могут проявлять и слабые агонистические эстрогенам свойства.

Агонистическое влияние антиэстрогенов проявляется в основном в начальный период их действия, т. е. относится к «ранним» эффектам. Введение целого ряда антиэстрогенов приводит к транслокации антиэстрогенрецепторных комплексов в ядро и некоторой стимуляции синтеза ДНК, белка и даже увеличению матки, но длительно поддерживаться эти реакции не могут. Истинным утеротропным действием антиэстрогены не обладают. Это связывают с тем, что несмотря на порой весьма длительную задержку в ядре комплекса антиэстрогена с рецептором (доходящую до 19 дней для нафоксидингидрохлорида) не происходит активации хроматина и значительного усиления белкового синтеза, в том числе и синтеза рецепторных белков, что ведет к истощению цитоплазматического пула эстрогенных рецепторов (Katzenellenbogen et al., 1977).

Более того, степень проявления антиэстрогенного действия этих веществ зависит от их способности поддерживать низкий уровень

рецепторов в цитозоле (Ferguson, Katzenellenbogen, 1977), тогда как агонистическая активность соответствует концентрации комплекса лиганда с рецептором в ядре.

В то же время некоторые антиэстрогены (нафоксидин, производные кломифена) не только хуже эстрогенов связываются с цитоплазматическим рецептором, что ограничивает транслокацию, но имеют иные временные характеристики этого процесса: аккумуляция их в ядерной фракции происходит более медленно.

Вместе с тем сродство комплексов антиэстрогенов с рецепторами к акцепторным местам на хроматине, возможно, более низкое, чем у эстроген-рецепторных комплексов.

Так, транслоцированные в ядро рецепторы эстрадиола присутствуют в двух формах: экстрагируемой 0.3 М КСl и солерезистентной, а в комплексе с кломифеном транслоцированные рецепторы полностью экстрагируются из ядерной фракции 0.3 М КСl. Эти эксперименты позволяют предполагать, что ядерная солерезистентная форма рецепторов, образуемая только эстрогенами, необходима для истинного роста матки, а экстрагируемые хлористым калием рецепторы обеспечивают ранние ответы на эстрогены (Ruh, Baudendistel, 1977).

Приведенные здесь данные позволяют определить значение различных звеньев рецепторного цикла, кинетических характеристик рецепторных процессов, различных форм лиганд-рецепторных комплексов в проявлении утеротропной реакции. Однако, к сожалению, некоторые вещества из обширного семейства антиэстрогенов не позволяют утвердиться в сложившихся было представлениях. Так, сильный антагонист эстрогенов моногидрокситамоксифен и эстрадиол имеют одинаковое сродство к рецепторам и одинаковую временную динамику уровней ядерных и цитозольных рецепторов в ответ на введение в организм, однако утеротропным действием моногидрокситамоксифен практически не обладает (Dix, Jordan, 1980).

Такого рода факты находятся в определенном противоречии с концепцией Дженсена об инициации всех гормональных эффектов эстрогенов через связывание с рецепторами. Они наводят на мысль о необходимости проанализировать механизмы участия рецепторов эстрогенов в синтезе отдельных функционально важных белков матки с тем, чтобы попытаться определить то ключевое звено в цепи метаболических реакций, которое определяет ход развития всех утеротропных процессов. Естественно, здесь привлекают внимание в первую очередь белки-маркеры эстрогенного действия, синтез которых индуцируется и в наибольшей степени, и в первую очередь введением эстрогенов.

Еще в 1966 г. был обнаружен эстрогениндуцированный белок в матке у крыс. Увеличение его синтеза наблюдается через 40 мин после введения эстрадиола *in vitro* и через 1 ч *in vivo*. Он обнаружен как в цитозоле, так и в субклеточных частицах. Индукция этого белка эстрадиолом является РНК-зависимой и угнетается актиномицином Д. Этот белок найден также в других эстроген-

зависимых органах: гипофизе, гипоталамусе, коре мозга, печени (Vertes et al., 1981). Скорость его синтеза изменяется в зависимости от фазы эстрального цикла. Максимальный синтез наблюдается в стадии проэструс, в стадии эструс и метэструс белок не обнаруживается (Katzenelenbogen, 1975). Эти данные соответствуют динамике уровня ядерных рецепторов эстрадиола.

Фракция индуцированного белка составляет всего 1 % от всех синтезирующихся в матке белков. В последние годы предприняты попытки изучения физико-химических свойств этого белка (Manak et al., 1980). Молекулярная масса индуцированного белка у крыс составляет приблизительно 45 кД, углеводного компонента в его молекуле не обнаружено.

В тканях матки женщины также обнаруживаются эстроген-индуцированные белки. В зависимости от фазы менструального цикла в эндометрии наблюдаются изменения в синтезе единственного белка с молекулярной массой 24 кД (Ciocca et al., 1983). При этом в поверхностном эпителии подъем содержания этого белка наблюдается особенно сильно в середине лютеиновой фазы цикла. В железистом эпителии обнаруживается 2 пика — в перивуляторный период и на 21 день цикла. Наблюдаемый подъем его содержания в секреторную фазу не дает оснований безусловно относить его стимуляцию за счет действия одних лишь эстрогенов. По некоторым другим данным (Jacobelli et al., 1981) введение эстрогенов женщинам вызывает синтез белка с молекулярной массой 55 кД.

Функциональное значение индуцированного эстрогенами белка продолжает обсуждаться. В свое время некоторые авторы (Vaulieu et al., 1972) отвели ему решающую роль в механизме действия эстрогенов, называя его «ключевым промежуточным белком». Согласно «каскадной теории» действия эстрогенов, гормоны вызывают начальную транскрипцию одного этого белка, который затем активирует РНК-полимеразу I типа, а на следующем этапе происходит увеличение скорости синтеза множества мРНК и соответствующих белков. Увеличение РНК-полимеразы I типа, вызываемое индуцированным белком, требует участия рецепторов эстрогенов.

Есть мнение (Maigresse, Galand, 1980), что быстро синтезируемый после действия эстрогенов в матке крыс кислый белок с молекулярной массой 35 кД, возможно, родственному индуцированному белку, вскоре переносится в ядро и прочно связывается с хроматином на период до 12 ч. Предполагается, что эти свойства связаны с регуляторной ролью белка в отношении стимулированных эстрогенами геномных эффектов. Окончательное суждение о функциональной роли индуцированного белка, вероятно, сформируется после расшифровки его биохимической природы.

Одним из компонентов этого белка в матке мышей является химотрипсиноподобная протеаза (Finley et al., 1983). Специфические протеазы могут играть важную роль в осуществлении эффектов эстрогенов. Протеолитическая активность, ассоциирован-

ная с клеточной мембраной, очевидно, имеет значение для стимуляции образования цАМФ; ядерные протеазы, расщепляя гистоны, увеличивают матричную активность ДНК, благодаря чему стимулируется синтез РНК (Segal, Koide, 1981).

Недавно опубликовано, что основным компонентом индуцированного белка является креатинкиназа ВВ типа (Reiss, Kaye, 1982). В этом случае, очевидно, индуцированный белок ответствен за энергообеспечение анаболических эффектов эстрогенов и не может служить специфическим ключевым белком, определяющим течение стимулированных эстрогенами метаболических реакций в органах-мишенях. При наличии значительной рецепции эстрадиола в тканях яичников, вагины, в преоптической зоне и медиобазальном гипоталамусе у неполовозрелых крыс через 1 ч после введения эстрадиола наблюдается существенное возрастание биосинтеза изоэнзима ВВ креатинкиназы (Malnick et al., 1983). В то же время у женщины активность креатинкиназы в секреторную фазу цикла в эндометрии в 3 раза выше, чем в пролиферативную, что предполагает возможный контроль этого фермента прогестероном (Satyaswagoor, Mortel, 1983).

В качестве маркера эстрогенной зависимости в матке рассматривается также фермент пероксидаза. Этот энзим, катализирующий реакцию окисления различных субстратов перекисью водорода, является гемопротенидом, в молекуле имеется углеводный компонент.

Высокая активность этого фермента зарегистрирована у всех грызунов. В матке у женщины по некоторым данным уровень пероксидазы сравним с величинами, наблюдавшимися у грызунов (De Sombre, Lyttle, 1979). Эти данные получены с использованием гваякола в качестве субстрата пероксидазы. В наших опытах с применением орто-дианизидина как субстрата для окисления отмечена низкая активность пероксидазы в матке у женщин (в 5—10 раз ниже, чем в матке крыс).

У овариэктомированных и неполовозрелых животных введение эстрадиола увеличивает активность фермента, иногда весьма значительно (у мышей в 1000 раз), тогда как в тканях, рост которых не зависит от эстрогенов, индукция пероксидазы не отмечается. Возрастание активности фермента в матке было дозозависимым, а ингибция синтеза РНК и белка предотвращает индукцию фермента (Katz et al., 1982). Было показано, что увеличение активности фермента соответствует возрастанию веса матки и содержания ДНК. Отмечалась хорошая корреляция количества связанного в ядерной фракции матки меченого эстрадиола с уровнем активности пероксидазы через 12 ч после введения физиологических доз гормона.

Различные антиэстрогены предотвращают индукцию пероксидазы с помощью эстрогенов. С другой стороны, некоторые из них вызывают увеличение активности пероксидазы в соответствии с их агонистическими эстрадиолу свойствами (Keeping, Lyttle, 1982).

Приведенные факты, казалось бы, позволяют считать пероксидазу биохимическим маркером, отражающим эффекты взаимодействия эстрогенов с их рецепторами. Однако имеются данные, противоречащие этой надежде.

Динамика уровня активности пероксидазы у различных видов имеет свои особенности. У крыс отмечается двукратное увеличение уровня фермента в стадиях проэструс и эструс по сравнению с диэструсом и метэструсом (De Sombre, Lyttle, 1979). У мышей не обнаружено изменений активности фермента в зависимости от фазы цикла. Таким образом, динамика уровня активности фермента и рецепторного связывания не совпадают. Тестостерон ингибирует индукцию пероксидазы, вызываемую эстрадиолом и диэтилстильбэстролом, не изменяя уровень эстрогенных рецепторов (Jellinck et al., 1983). В период послеродовой инволюции в первые часы и дни после родов в матке крыс обнаруживается индукция активности пероксидазы, несмотря на низкий уровень рецепторов эстрадиола (Keeping, Lyttle, 1982a). Активность фермента в теле матки в 2 раза выше, чем в рогах, а содержание цитозольных и ядерных рецепторов эстрадиола выше в рогах по сравнению с телом матки у крыс (Affleck et al., 1981). Подобная закономерность отмечена и в матке у женщин.

Эта группа фактов настораживает в отношении признания пероксидазы репродуктивного тракта продуктом специфической генной экспрессии, вызываемой эстрадиолом, тем более, что источником этого фермента являются не только железистый эпителий эндометрия, но главным образом эозинофилы, имбибированные в ткани матки (Keeping, Lyttle, 1982). Рецепция эстрогенов в этих клетках в настоящее время практически не изучена, и, хотя известно, что проникновение эозинофилов в матку стимулируется эстрогенами и зависит от синтеза белка, трудно даже предполагать, каковы механизмы регуляции этого процесса и как связана с ним индукция активности пероксидазы.

В области гипотез находятся также представления о физиологической роли пероксидазы матки. Предполагалось, что этот фермент может принимать участие в терминации рецепторного цикла, так как эстрадиол является его возможным субстратом. Окисление стероида до феноксирадикала, возможно, способствует образованию водорастворимых метаболитов эстрадиола и таким образом инактивирует гормон. По аналогии с бактерицидным действием миелопероксидазы предполагается спермацидный эффект пероксидазы матки. Возможно, что пероксидаза матки, подобно одноименному ферменту из корней хрена, увеличивает содержание дитиозина в молекулах коллагена и приводит к возрастанию числа поперечных связей между полипептидными цепями и тем самым упрочняет петлистую сеть (Jellinck et al., 1979).

Неотъемлемым свойством эстрадиола является способность индуцировать образование рецепторов других гормонов и биологически активных веществ. В частности, описано стимулирующее действие эстрадиола на уровень рецепторов окситоцина (Alexan-

drova, Soloff, 1980), катехоламинов, серотонина (Ichida et al., 1983).

Наиболее изученным аспектом такого действия эстрадиола является индукция синтеза рецепторов прогестерона. С этой точки зрения рецептор прогестерона в цитозольной фракции можно также рассматривать как белок-маркер эстрогенного влияния на матку. Связана ли эта индукция рецептора прогестерона с предварительным увеличением связывания эстрадиола в ядерной фракции? Тамоксифен, как и эстрадиол, в соответствии с наблюдаемой транслокацией эстрогенных рецепторов в ядро стимулирует образование рецепторов прогестерона через 12 ч после введения, но длительно не поддерживает эффекта, так как рецепторы эстрогенов в цитозоле не возобновляются (Davies et al., 1979). Введение андрогенов в больших дозах может приводить к транслокации эстрогеновых рецепторов в ядро и синтезу рецепторов прогестерона (Zava, McGuire, 1978).

С другой стороны, при введении овариэктомированным крысам различных доз эстрадиола в течение различного времени наблюдали как стимуляцию, так и торможение синтеза собственных рецепторов, однако индукция цитозольных рецепторов прогестерона наблюдалась всегда (Manni et al., 1981).

Для выявления взаимосвязи между рецепцией эстрогенов и белками-маркерами эстрогенного действия мы предприняли собственные исследования. Первая серия опытов была проведена на интактных животных с введением физиологических доз эстрадиола или прогестерона в течение 1—7 дней. Через 24 ч после последней инъекции крыс забивали, определяли уровень рецепторов эстрадиола и прогестерона в цитозольной фракции, ядерных рецепторов эстрадиола, а также активность пероксидазы и креатинкиназы в экстрактах ткани матки. Вторую серию опытов провели на таких же крысах, но через 1.5 мес после овариэктомии. Рассчитывали коэффициенты корреляции между уровнем рецепторов эстрадиола и остальными изучавшимися показателями для первой и второй серии опытов отдельно.

Данные первой серии опытов, приведенные в табл. 1, показы-

Таблица 1

Коэффициенты корреляции между уровнем рецепторов половых стероидов и количеством белков-маркеров эстрогенного действия

Маркер эстрогенного действия	Количество рецепторов, фмоль/мг белка		
	эстрадиола в цитозоле	эстрадиола в ядрах	прогестерона в цитозоле
Активность пероксидазы	0.67 $p < 0.02$	0.49 $p < 0.05$	0.03 $p > 0.05$
Активность креатинкиназы	0.41 $p = 0.05$	0.56 $p < 0.02$	0.55 $p < 0.02$
Количество рецепторов прогестерона в цитозоле	-0.11 $p > 0.05$	0.008 $p > 0.05$	—

вают, что между активностью пероксидазы в матке и рецепцией эстрадиола в цитозольной и ядерной фракциях имеется достоверная положительная корреляция. С уровнем рецепции прогестерона эта величина не коррелирует. Активность креатинкиназы коррелирует с уровнем рецепторов не только эстрадиола, но и прогестерона. Зависимость между количеством рецепторов эстрадиола и прогестерона отсутствовала. В группах крыс с сохраненными яичниками после введения эстрадиола обычно наблюдалась тенденция к увеличению активности пероксидазы и креатинкиназы, возрастание уровня рецепторов прогестерона, а при введении прогестерона — торможение активности ферментов, особенно креатинкиназы.

После овариэктомии взаимосвязь между рецепторами эстрадиола и активностью ферментов-маркеров эстрогенного действия пропадает. Можно полагать, что для проявления этих взаимоотношений нужен определенный уровень секреции обоих половых стероидов, хотя индукция ферментов у овариэктомированных животных после введения эстрадиола проявляется даже значительно сильнее, чем у крыс с сохраненными яичниками.

У интактных крыс от содержания рецепторов эстрадиола более всего зависит активность пероксидазы. Возможно, эти показатели либо определяют друг друга, либо под воздействием экзогенных гормонов изменяются синхронно.

Уровень креатинкиназы, которую считают компонентом эстрогениндуцированного белка, в наших опытах одинаково зависел от количества рецепторов как эстрадиола, так и прогестерона, следовательно, этот фермент нельзя в полной мере считать индикатором эстрогенного влияния на матку через собственные эстрогенные рецепторы.

В отношении рецепторов прогестерона, по нашим данным, можно с уверенностью заключить, что индукция этих молекул при различных гормональных воздействиях происходит независимо от синтеза и транслокации в ядро рецепторов эстрадиола. Таким образом, с точки зрения современных представлений о механизмах действия гормонов через связывание со специфическими рецепторами следует подвергнуть критике само понятие «белок-маркер» гормонального влияния.

Специфическое биологическое действие прогестерона в матке состоит, во-первых, в его антиэстрогенном эффекте, т. е. в противодействии утеротропному влиянию в миометрии и пролиферативным изменениям в эндометрии, вызываемым эстрогенами; во-вторых, в специфической перестройке желез эндометрия с усилением их секреторной активности, что необходимо для нормального оплодотворения яйцеклетки и развития бластоцисты. Поиски исследователей по первому направлению позволили выявить, что прогестерон не связывается со специфическими рецепторами эстрогенов, но снижает их число, что способствует антиэстрогенному эффекту. Кроме того, было установлено, что прогестерон изменяет метаболизм эстрадиола в матке, ускоряя его превращение в более

слабое по биологическому эффекту соединение — эстрон, благодаря активации 17β -гидроксистероиддегидрогеназы. Этот путь прогестеронового влияния наиболее хорошо изучен в эндометрии человека. Было показано, что активность 17β -гидроксистероиддегидрогеназы в эндометрии женщины в несколько раз возрастает в лютеиновую фазу цикла (Schmidt-Gollwitzer et al., 1979; Tseng, Gurpide, 1979). Возрастание активности фермента можно индуцировать введением различных естественных и синтетических прогестинов. Некоторые авторы полагают, что снижение числа рецепторов эстрадиола в матке под влиянием прогестерона является следствием усиления активности 17β -гидроксистероиддегидрогеназы. Это уменьшает уровень эстрадиола, индуцирующего синтез собственных рецепторов. Уровень ядерных рецепторов эстрадиола и активность этой дегидрогеназы в эндометрии женщины находятся в обратной зависимости (King, Whitehead, 1980).

Активность энзима считалась хорошим маркером прогестеронового влияния на эндометрий. Но этот показатель нельзя считать абсолютным, так как 20α -гидроксипрогестерон также может быть субстратом для данного фермента, который является одновременно 20α -дегидрогеназой (Tseng, Gurpide, 1979). На активность фермента могут оказывать ингибирующее действие слабые андрогены, при этом андростендиол действует по типу конкуренции с эстрадиолом за энзим, а дегидроэпиандростерон и его сульфат уменьшают сродство фермента к эстрадиолу (Bonny et al., 1983). В миометрии человека связь активности 17β -гидроксистероиддегидрогеназы с прогестероновым действием является менее тесной, что подтверждается отсутствием динамики по фазам цикла.

Кроме 17β -гидроксистероиддегидрогеназы прогестерон усиливает активность и других дегидрогеназ, из которых наиболее сильно активизируется изоцитратдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа (Takehisa, 1980), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (King, Whitehead, 1980).

Второй аспект действия прогестерона на матку изучается главным образом путем исследования белковых компонентов секрета маточных желез и децидуальной ткани. При этом выявлено, что прогестерон вызывает резкое увеличение как количества продуцируемых белков, так и изменение их качественного состава. Часть из этих белков имеет сывороточное происхождение, но, кроме того, появляются и специфические белки, которых не находят в сыворотке крови и тканях матки при отсутствии прогестеронового влияния. Одним из первых таких белков был утероглобин или бластокинин, выделенный из матки кроликов. Его продукция зависит от дозы прогестерона и индуцируется большим спектром естественных и синтетических прогестинов (Chilton et al., 1977; Tucker, Schultz, 1977). Была выделена информационная РНК для утероглобина кролика, увеличение синтеза которой является ранним эффектом действия прогестерона, проявляющимся уже через 2 ч после его введения (Loosfelt et al.,

1981). Показано, что утероглобин обладает способностью связывать прогестерон с довольно высоким сродством, хотя и значительно более низким, чем рецепторы прогестерона (Frydlandsky, Milgroom, 1976).

Изучение белкового состава маточной жидкости, полученной в разные фазы цикла у других видов животных, показало, что у коров специфическим белком прогестинового действия можно считать лакоферрин (Dixon, Gibbons, 1979), у свиней — щелочную фосфатазу. В последнее время уделяется много внимания изучению белкового состава маточной жидкости и децидуальной ткани у человека. Применение современных методов фракционирования белков и изучение антигенного состава исследуемых тканей позволило многим авторам выделить от одного до пяти специфических компонентов, появляющихся только в лютеиновую фазу цикла или в ранние сроки беременности (Joshi et al., 1980; Richardson et al., 1984). Петрунин с соавт. (1983) назвали выделенный ими из секреторного эндометрия белок α_2 -микроглобулином. Этот белок отсутствовал в эндометрии, взятом в пролиферативную фазу цикла, при ановуляторных циклах и при аменорее. Некоторые из специфических для лютеиновой фазы белков эндометрия образуются в нем в довольно больших количествах, поэтому существуют предложения использовать определение специфического гликопротеида с молекулярной массой 47 кД, как клинический тест для выявления прогестативного влияния на эндометрий у женщин (Joshi, 1983). Ряд белков, которые считались продуктами секреции плацентарными тканями, был затем обнаружен в секреторном эндометрии и децидуальной ткани небеременных женщин, как, например, плацентарный белок ПП-12, и было показано, что его секреция индуцируется прогестероном (Rutanen et al., 1984). Индукцию синтеза специфических белков можно было вызвать *in vitro* добавлением прогестерона к инкубируемому эндометрию женщин (Strinden, Shapiro, 1983).

Функциональная роль большинства белков, индуцируемых прогестероном, не ясна. Чрезвычайное разнообразие их указывает на многообразие функционального назначения. По крайней мере некоторые из них являются ферментами: 17β -гидроксистероиддегидрогеназа и другие дегидрогеназы, щелочная фосфатаза, γ -глутамилтрансфераза, катепсин-D-лизосомальная пептидаза (Moulton, 1981; Tagachand, Eapen, 1982). Несомненна роль многих из описанных белков для питания и трансформации бластоцисты, т. е. они особенно важны на самых ранних этапах беременности. Поскольку прогестерон является антагонистом эстрогенов, не исключена возможность, что среди индуцированных им белков есть специфические ингибиторы эстрогенного действия. В некоторых работах отмечается, что под влиянием прогестерона наряду с индукцией или увеличением биосинтеза ряда белков наблюдается и уменьшение продукции некоторых протеинов (Strinden, Shapiro, 1983).

Для того чтобы решить вопрос о роли рецепторов прогестерона в осуществлении описанных выше его эффектов, необходим детальный анализ выраженности этих влияний в сопоставлении с уровнем рецепторов прогестерона. Однако в большинстве работ этого не проводилось. В одном из исследований (Walters, Clark, 1979) показано, что ингибция прогестероном утеротропного действия эстрогенов прямо коррелировала с количеством прогестероновых рецепторов в цитозоле матки овариэктомированных крыс. Известно, что некоторые из индуцированных прогестероном протеинов появляются уже в ранней лютеиновой фазе (вслед за пиком рецепторов прогестерона в цитозоле, на фоне высокого уровня ядерных его рецепторов) и снижаются уже в середине лютеиновой фазы, что по времени соответствует периоду спада рецепторной активности эндометрия. Однако некоторые из так называемых маркеров прогестеронового действия, например 17 β -гидроксистероиддегидрогеназа и ряд других белков, достигают максимальных значений в середине лютеиновой фазы или на ранних сроках беременности, когда уровень рецепторов прогестерона в цитозоле и ядре уже значительно снижен. Изменение их активности больше соответствует динамике прогестерона в крови, чем прогестероновых рецепторов.

В опытах с длительным введением прогестерона количество образовавшегося утероглобина было в 3 раза больше, чем может быть обеспечено тем уровнем мРНК, который синтезировался при этих воздействиях. Таким образом, прогестерон, по мнению авторов, оказывает двойной эффект — индуцирует мРНК и, кроме того, усиливает синтез специфического белка на посттранскрипционном уровне (Loosfelt et al., 1981).

РЕЦЕПЦИЯ ПОЛОВЫХ СТЕРОИДОВ В МАТКЕ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Справедливость сформулированных выше принципов гормональной регуляции половых стероидов не всегда удается подтвердить при введении гормонов интактным животным. Видимо, благодаря значительным компенсаторным возможностям организма изменения рецепции нивелируются посредством быстрых реакций со стороны гормонов-антагонистов и гомоспецифических эффектов.

В то же время анализ динамики уровня половых стероидов и их рецепторов в течение менструального и эстральных циклов подтверждает, что в физиологических условиях гормональная регуляция рецепции осуществляется в основном по правилам, описанным для модельных опытов.

Это положение легко проследить на примере длительных половых циклов, в которых фазы преимущественного влияния на матку эстрогенов и прогестерона четко выделяются. Показано, что у женщин в цитозольной фракции эндометрия максимальное увеличение рецепторов эстрадиола достигается уже к середине

пролиферативной фазы, параллельно начальному возрастанию секреции эстрадиола. В дальнейшем происходит увеличение уровня рецепторов в ядерной фракции, который достигает максимума в конце пролиферативной фазы в перивульторный период. Несмотря на начавшееся снижение уровня цитозольных рецепторов эстрадиола, в этот период наблюдается наивысшее содержание общего числа связывающих мест для эстрадиола (Bayard et al., 1978).

После овуляции в раннюю секреторную фазу снижение уровня эстрадиола в крови и увеличение секреции прогестерона тормозят синтез рецепторов эстрадиола сначала в цитозоле, а затем в ядрах. Содержание рецепторов в миометрии значительно ниже, чем в эндометрии, хотя динамика рецепции в зависимости от фазы цикла в этих тканях идентична (Schmidt-Gollwitzer et al., 1979).

В наших исследованиях изучены образцы тканей матки женщин, оперированных по поводу фибромиомы, и выявлены те же закономерности, что были описаны выше. В эндометрии найдено значительное возрастание цитозольных рецепторов эстрадиола в середине пролиферативной фазы, что сочетается с подъемом содержания эстрадиола в крови маточной вены. Рецепция эстрадиола в маточных артериях и фаллопиевых трубах обнаруживает те же циклические изменения, что и в матке (Pino et al., 1982; Lantta et al., 1983).

Общее содержание рецепторов прогестерона в эндометрии повышается в течение пролиферативной фазы параллельно возрастанию концентрации эстрадиола и достигает наивысших значений в позднюю пролиферативную фазу или к моменту овуляции. Во время пролиферативной фазы цикла наблюдается положительная корреляция между содержанием эстрадиола в плазме и количеством общих рецепторов прогестерона в эндометрии (Kreitmann et al., 1979). Ядерные рецепторы прогестерона в фолликулярную фазу также увеличиваются. Уже в начале лютеиновой фазы наблюдается снижение уровня цитозольных рецепторов, видимо, в связи с увеличением содержания прогестерона в крови и снижением секреции эстрадиола, и с середины цикла общее количество рецепторов прогестерона становится значительно ниже, чем в его начале. Количество ядерных рецепторов прогестерона достигает максимальных значений в начале лютеиновой фазы, а затем, еще в разгар лютеиновой фазы, оно заметно снижается. Это является следствием подавления синтеза рецепторов прогестерона в цитозоле. Такая же динамика рецепторов прогестерона в зависимости от фазы менструального цикла наблюдается в шейке матки и в фаллопиевых трубах (Sanborn et al., 1978; Pino et al., 1982). В миометрии содержание рецепторов прогестерона всегда ниже, чем в эндометрии. С середины цикла, в период овуляции, наблюдается увеличение уровня как цитозольных, так и ядерных рецепторов в этой ткани (Schmidt-Gollwitzer et al., 1979).

В наших исследованиях у женщины с фибромиомой наблюдали значительное увеличение концентрации рецепторов прогестерона

в цитозоле эндометрия в перiovуляторный период. Возрастаение рецепции прогестерона начиналось после достижения максимального уровня эстрадиола в маточной вене, в период, когда содержание рецепторов эстрадиола начинало уже уменьшаться. Уменьшение уровня прогестероновых рецепторов в цитозоле эндометрия и миометрия совпадало с началом возрастания содержания прогестерона в маточной вене. Очевидно, при достижении определенного уровня прогестерона в крови начинает проявляться его ингибирующее действие на собственные рецепторы в цитозоле. Этот эффект на 19—24-й день цикла столь значителен, что второй подъем эстрадиола в крови, наблюдаемый в эти сроки, уже не сопровождается какой-либо стимуляцией рецепции прогестерона.

Низкий уровень рецепции прогестерона в эндометрии на протяжении второй половины лютеиновой фазы оставляет открытым вопрос о механизмах действия прогестерона в этот период.

По нашим данным, в миометрии было более низкое содержание рецепторов прогестерона, чем в эндометрии в течение пролиферативной и ранней секреторной фаз цикла. Затем, в позднюю секреторную фазу, наблюдается выравнивание концентраций рецепторов в этих тканях.

У животных с длительным эстральным циклом (овцы, коровы) максимальный уровень рецепции половых стероидов соответствует подъему эстрогенов в крови в день эструса, значительное количество рецепторов обнаруживается в фолликулиновую фазу, а минимальное — в лютеиновую фазу (Koligan, Stormshak, 1977; Miller et al., 1977). Таким образом, регуляция уровня рецепции эстрогенов и прогестерона осуществляется принципиально так же, как и в женском половом цикле.

У лабораторных животных с коротким эстральным циклом трудно выделить лютеиновую фазу и проследить влияние эстрогенов и прогестерона в отдельности. В наших опытах исследовалось содержание рецепторов в течение эстрального цикла у крыс. Наивысший уровень цитозольных рецепторов эстрадиола наблюдается в стадии диэструс во время начала подъема содержания эстрадиола в крови. Дальнейшее увеличение секреции эстрадиола во время проэструса приводит к возрастанию транслокации рецепторов в ядро (табл. 2). На этой стадии цикла наблюдается также наивысшая концентрация рецепторов прогестерона в цитозоле и наивысшее содержание прогестерона в плазме крови.

По данным литературы, максимальное увеличение уровня ядерных рецепторов прогестерона приходится также на проэструс (Vu Hai et al., 1978).

В стадии эструс определяется минимальное содержание эстрадиола в крови, а также рецепторов эстрадиола и прогестерона в матке. В связи с тем что у этих животных отсутствует лютеиновая фаза, нельзя проследить тормозящие эффекты прогестерона на уровень рецепторов половых стероидов.

Результаты наших исследований соответствуют большинству литературных данных. Можно заключить, что для закономерной

Динамика содержания рецепторов половых стероидов в матке и уровня эстрадиола и прогестерона в крови у крыс в течение эстрального цикла

Стадия цикла	Содержание рецепторов, фмоль/мг белка			Содержание в крови	
	эстрадиола в цитозоле	эстрадиола в ядрах	прогестерона в цитозоле	эстрадиола, пг/мл	прогестерона, пг/мл
Диэструс (Д)	322±22	125±11	44.8±9.8	15.2±2.2	13.7±2.2
Прозэструс (П)	298±26	157±13	107±16	32.3±5.7	17.7±4.7
Эструс (Э)	213±15	120±8	32±3.4	8.0±0.7	9.0±0.8
Достоверность	$p_{д-э} < 0.001$ $p_{п-э} < 0.01$	$p_{п-э} < 0.02$	$p_{д-п} < 0.01$ $p_{п-э} < 0.001$	$p_{д-э} < 0.01$ $p_{п-э} < 0.001$	

смены эффектов эстрогенов и прогестерона в матке в течение полового цикла существенное значение имеет изменение уровня их рецепторов, которое в свою очередь определяется изменением секреции гормонов. Конечный результат гормонального влияния в клетке, возможно, определяется соотношением количества рецепторов эстрадиола и прогестерона. Мишенью этих гормонов в матке, вероятно, являются различные популяции клеток. Эстрадиол действует на покоящиеся клетки, вызывая их деление, тогда как влияние прогестерона осуществляется на клетки, которые уже вовлечены в клеточный цикл и приступили к делению (Conti et al., 1984).

Большое число работ посвящено изучению рецепторов половых гормонов при беременности. Уровень рецепторов прогестерона в матке при беременности закономерно изменяется в соответствии с уровнем гормона в крови и физиологическими изменениями ткани матки на различных этапах беременности.

В самом начале беременности у большинства животных (морских свинок, крыс, коров и др.) концентрация цитозольных и ядерных рецепторов прогестерона в матке низкая (Vu Hai et al., 1978; Gautray et al., 1980; Jänne, 1981). В дальнейшем, в период имплантации яйцеклетки, наблюдается некоторое увеличение концентрации ядерных рецепторов при одновременном снижении цитозольной формы. По мере последующего прогрессирования беременности отмечается постепенное увеличение цитозольных рецепторов прогестерона. Так, у крыс в целом с 3-го по 22-й день беременности общее число рецепторов прогестерона в цитозоле клеток матки возрастало более чем в 6 раз (Vu Hai et al., 1978). Параллельно наблюдалось увеличение содержания общего белка в матке. Наивысшая концентрация ядерных рецепторов прогестерона достигалась к середине беременности. Повышение ядерных рецепторов прогестерона в матке при беременности связано с появлением так называемого прогестеронового блока, выражающегося в том, что прогестерон, действуя как антагонист эстрогенов, снижает возбудимость и сократимость матки и создает тем самым

благоприятные условия для развития плода. К концу беременности средняя концентрация ядерных рецепторов прогестерона снижается. Таким образом, началу родов у многих животных предшествует не только снижение уровня сывороточного прогестерона, но и падение содержания ядерных рецепторов этого гормона (Vu Hai et al., 1978). Это приводит к снятию «прогестеронового блока» и усилению эстрогенного влияния на матку.

В матке человека наблюдается несколько различная динамика рецепторов прогестерона в эндометрии и миометрии. В эндометрии уровень общих (ядерных и цитозольных) рецепторов прогестерона на 8—10-й неделях беременности соответствует их содержанию в секреторной фазе цикла. Сохранение достаточно высокого уровня рецепторов прогестерона в эндометрии важно для имплантации зиготы и сохранения беременности. При привычном невынашивании беременности при сроке 8—10 недель содержание рецепторов прогестерона в эндометрии резко снижено (Юдаев и др., 1976). К концу беременности у женщин уровень рецепторов прогестерона в эндометрии значительно возрастает — до величин их содержания в период предовуляторного пика. (Kreitman, Bayard, 1979). В миометрии же содержание общих рецепторов прогестерона падает более чем в 20 раз по сравнению с пиком их уровня в пролиферативную фазу цикла (Giannopoulos, Tulchinsky, 1979). Для обеих тканей матки женщин характерно перераспределение рецепторов прогестерона с резким падением в цитозоле и накоплением в ядре, причем и в миометрии, несмотря на падение общего уровня рецепторов, концентрация ядерной формы остается высокой — в пределах величин менструального цикла. Это соответствует сохранению высокого уровня секреции прогестерона до конца беременности у женщин и ставит под сомнение необходимость преодоления у них «прогестеронового блока» для развязывания родовой деятельности (Kreitman, Bayard, 1979).

Таким образом, общим для человека и животных является нарастание уровня ядерных рецепторов прогестерона в матке при беременности. Это происходит на фоне повышенного содержания прогестерона в крови, что, согласно сложившимся представлениям, должно приводить к снижению уровня рецепторов прогестерона. Тем не менее при беременности отмечается обратная картина. По-видимому, механизм гомоспецифической регуляции уровня рецепторов прогестерона в матке в условиях постоянного воздействия высоких концентраций гормонов имеет иной характер или же реализуются иные, неизвестные нам регуляторные взаимоотношения между периферическими гормонами (эстрогены, прогестерон), с одной стороны, и их рецепторами — с другой.

Содержание рецепторов эстрадиола при беременности у животных (крысы, кролики, свиньи, коровы) начинает резко повышаться с первых дней беременности, достигая максимума ко времени имплантации бластоцисты, что у крыс соответствует 5-му дню беременности (Deaver, Guthrie, 1980; Gautray et al., 1980). Этот

подъем рецепции эстрадиола указывает на синергическое действие эстрадиола и прогестерона в обеспечении процессов имплантации. В дальнейшем уровень рецепторов эстрогенов в эндометрии существенно снижается, что связывают со значительным и стойким повышением уровня секреции эстрогенов в этот период, приводящим к снижению уровня собственных рецепторов и к транслокации их в ядро. В миометрии имеет место такая же динамика рецепторов эстрадиола, но выраженная в значительно меньшей степени.

В конце беременности у ряда животных (крысы, кролики) количество рецепторов эстрогенов в миометрии и эндометрии начинает существенно возрастать, особенно непосредственно в предродовый период (Ju Winston, Leung, 1982; Quirk, Currie, 1984).

У женщин не проводилось исследование уровня рецепторов эстрадиола в период имплантации. На более поздних сроках беременности, начиная с 8—10 недель, отмечается значительное снижение общего уровня (ядерных и цитозольных) рецепторов эстрадиола в миометрии и эндометрии женщин. Их концентрация в этот период в 5 раз ниже, чем во время пика, наблюдаемого в пролиферативную фазу цикла, и соответствует величинам, свойственным концу секреторной фазы, когда содержание их минимально. В сроки от 8—10 недель до конца беременности уровень общих рецепторов эстрадиола в матке женщины существенно не изменяется, но происходит их перераспределение с резким падением цитозольной и накоплением ядерной фракции, которая к концу беременности возрастает в 5 раз (Kreitman, Bayard, 1979; Giannopoulos et al., 1980).

Увеличение ядерной фракции рецепторов эстрадиола, общее для человека и животных, имеющее место в предродовый период, вероятно, способствует усилению эстрогенного влияния на миометрий, необходимого для развязывания родовой деятельности. У женщин, в отличие от животных, это происходит без существенного увеличения уровня эстрадиола в крови.

Значительный интерес представляют данные об изменениях рецепции половых стероидов в матке в онтогенезе. Рецепторы половых гормонов появляются в матке на ранних этапах эмбрионального развития (уже в мюллеровых протоках), при этом по своим физико-химическим свойствам они не отличаются от рецепторов зрелого организма (Hamilton et al., 1979; Simuda Pasqualini, 1981; Giambiagi et al., 1984). В дальнейшем, по мере роста и развития организма, а также дифференцировки его тканей рецепция эстрадиола прогрессивно нарастает. Содержание рецепторов эстрадиола в эмбриональной матке морских свинок к 50-му дню внутриутробного развития в 10 раз превышает их концентрацию в мюллеровых протоках на 30—35-й день развития (Simuda, Pasqualini, 1981).

Показано, что рецепторное связывание эстрадиола цитоплазматической и ядерной фракциями ткани матки возрастает в 4 раза с 1-го по 10-й день после рождения крыс (Barbanel, Assenmacher, 1980). Описанная динамика концентрации цитозольных рецепто-

ров эстрадиола не зависит от функционирования яичников, так как овариэктомия крыс в 2-дневном возрасте не влияет на уровень рецепторов. На основании этого приходят к заключению об автономности синтеза рецепторов эстрадиола в клетках матки неполовозрелых животных в этот период (Мицкевич, 1978). Далее между 10-м и 20-м днями постнатального развития происходит уменьшение количества цитоплазматических и ядерных рецепторов эстрадиола в матке, что связывают с началом активной секреции эстрогенов яичниками. Падение уровня рецепторов эстрадиола достигает плато к 30-му дню развития, а следующий, довольно резкий пик снижения их концентрации имеет место в период полового созревания. Циторекцепторный аппарат для прогестерона также формируется еще в эмбриональном периоде развития, однако в последующем, к началу рождения и в ранний постнатальный период, концентрация рецепторов прогестерона в матке изменяется незначительно. Рецепция прогестерона начинает нарастать в препубертатный период (Milgrom et al., 1972; Simuda, Pasqualini, 1984).

Важной особенностью динамики уровня рецепторов эстрадиола в онтогенезе является то, что увеличение их концентрации в матке обычно предшествует усилению роста органа, а также его эмбриональной и постнатальной дифференцировке (Мицкевич, 1978). На ранних этапах постнатального развития интенсивность нарастания рецепторов эстрадиола в матке значительно превышает скорость деления ее клеток, и только при выходе концентрации рецепторов на плато увеличение числа клеток начинает идти с повышенной скоростью.

Становление эстрогензависимых реакций матки приходится на разное время развития. Так, у крыс при введении эстрогенов индукция синтеза орнитиндекарбоксилазы наблюдается уже на 2—5-й день, синтез индуцированного протеина — на 5—10-й день, максимум нарастания сырого веса матки, концентрации РНК и фосфорилирования 2-дезоксиглюкозы — на 10—15-й день, максимальный синтез ДНК — на 30—31-й день постнатального развития (Мицкевич, 1978).

В крови эмбрионов и в первые дни постнатальной жизни содержится большее количество α -фетопротейна, связывающего эстрогены. Поэтому реализация эстрогензависимых реакций матки на ранних этапах развития сдерживается несмотря на наличие сформированного рецепторного аппарата (Simuda, Pasqualini, 1981). Концентрация α -фетопротейна в крови крыс снижается к концу 3-й недели постнатального развития в 6 раз, и это хорошо коррелирует по времени с усилением эстрогензависимых реакций матки (Harmon, Kimel, 1981—1982).

Важное значение имеют нарушения системы циторекцепции половых гормонов в механизмах возрастных изменений тканевой чувствительности органов-мишеней. В ряде работ показано, что при старении происходит падение концентрации эстрадиолсвязывающих мест в матке на 40—80 % (Change, Roth, 1979).

В большинстве работ по этому вопросу не выявлено различий в связывающем средстве (K_d) между эстрадиолом и рецепторами у молодых и старых животных. Однако, согласно другим данным (Saiduddin, Zassenhaus, 1979), в цитозоле матки молодых крыс линии Фишер обнаруживается два вида рецепторных молекул с коэффициентом седиментации 4.5 S и 7.5 S, а у старых — только 4.5 S.

Возрастные изменения в рецепторном связывании хорошо коррелируют с уменьшением способности эстрогенов регулировать клеточную пролиферацию и метаболизм углеводов в матке.

В наших исследованиях получена корреляция нарушения репродуктивной функции и уровня рецепторов эстрадиола в матке крыс при старении: уровень рецепторов эстрадиола в матке был ниже в группе 17-месячных животных с преобладающим эструсом, неспособных дать потомство, по сравнению с его концентрацией у фертильных самок того же возраста (табл. 3).

Таблица 3

Рецепторное связывание эстрадиола субклеточными фракциями ткани матки в зависимости от возраста и фертильности крыс

Группы крыс	Связывание эстрадиола, фмоль/мг белка	
	ядерная фракция	цитозольная фракция
Нормально циклирующие крысы в стадии эструса:		
а) возраст 6—7 мес	128 ± 10	253 ± 18
б) возраст 1 г	107 ± 31	225 ± 32
в) возраст 17 мес и старше	111 ± 14	237 ± 42
Крысы с постоянным эструсом в возрасте 17 мес и старше	67 ± 11 *	144 ± 11 *

* — различие достоверно по отношению к группе, а — $p < 0.001$ в — $p < 0.05$

Динамика возрастных изменений прогестероновых рецепторов в матке описана в единичных работах (Saiduddin, Zassenhaus, 1979). В отличие от рецепторов эстрадиола авторам не удалось выявить достоверных изменений рецепторного связывания прогестерона тканью матки при старении животных.

При анализе приводимых данных возможно предположить два реальных механизма изменения рецепторного связывания эстрогенов при старении: нарушаются сами рецепторные молекулы и перестают нормально функционировать или нарушаются процессы синтеза и/или деградации рецепторов. Против первого предположения имеются данные, свидетельствующие о том, что при старении отношение иммунореактивного пула к функциональному пулу рецепторов не изменяется, т. е. возрастная потеря рецепторов эстрадиола не обусловлена появлением биологически неактивных рецепторных молекул. Вторая возможность представляется более

вероятной, поскольку внутриклеточный синтез и распад рецепторов эстрадиола и прогестерона находятся под контролем своих собственных и прочих гормонов, уровень которых с возрастом изменяется (Баранов и др., 1972; Конунге, 1982).

Необходимо отметить, что в реализацию гормонального эффекта вовлекается ряд внутриклеточных процессов (активация и транслокация рецепторов в ядро, взаимодействие с хроматином, депрессия специфических генов и т. д.) и каждый из них в свою очередь может подвергаться изменениям при старении. При этом выявленные изменения обусловлены как возрастной динамикой механизмов гормональной регуляции рецепторных процессов, так и возрастными изменениями самих клеток-мишеней (Конунге, 1982).

Изучению рецепции половых гормонов при различных патологических состояниях полового аппарата посвящены отдельные разрозненные работы. Почти во всех исследованиях обнаруживаются отличия уровня рецепции половых гормонов от нормы, но при этом трудно установить, является ли это отличие первичным, обусловленным патологией самого рецепторного звена, или вторичным, вызванным изменением секреции половых гормонов.

При наступлении климактерия наряду с нарушением характера менструального цикла имеют место различные отклонения в структуре гормонзависимых тканей. Содержание рецепторов эстрадиола в цитозоле эндометрия в перименопаузальный период варьирует, являясь наиболее низким в гипопластической и наиболее высоким в гиперпластической ткани (Trevoux, 1983). При наступлении менопаузы, характеризующейся отсутствием цикличности секреции половых гормонов и сохранением постоянно низкого их уровня в крови, содержание рецепторов эстрадиола в цитозоле эндометрия соответствует их концентрации в пролиферативной фазе цикла, а в миометрии превышает ее (Evans et al., 1974; Illingworth et al., 1975). Содержание рецепторов прогестерона в этой ткани резко снижено — ниже, чем в секреторную фазу нормального цикла, когда уровень этих рецепторов минимален (Illingworth et al., 1975; Kokko et al., 1981). Это, вероятно, отражает недостаток эстрогенного воздействия, которое обуславливает индукцию прогестинных рецепторов.

В постменопаузальном периоде сохраняется возможность нормального ответа рецепторов половых гормонов на гормональную регуляцию. Так, введение антиэстрогенов, приводящее к атрофии эндометрия, сопровождается снижением уровня цитозольных рецепторов эстрадиола. В то же время длительное введение эстрогенных препаратов, сохраняющее пролиферативное состояние эндометрия, также приводит к снижению уровня рецепторов эстрадиола в цитозоле и к возрастанию их в ядре (King, Whitehead, 1980; Kokko et al., 1981).

Добавление прогестинных компонентов после длительного введения эстрогенов резко снижает уровень ядерных рецепторов эстрадиола, что является характерным для ответа ткани-мишени

на прогестерон. Регуляция рецепторов прогестерона у женщин в постменопаузальный период также соответствует представлениям о гормональном влиянии на их уровень: лечение прогестинными препаратами снижает уровень цитозольных рецепторов прогестерона (King, Whitehead, 1980), а терапия эстрогенами вызывает их увеличение как в миометрии, так и в эндометрии (Hillingworth et al., 1975; Kokko et al., 1981).

При гиперплазии эндометрия у женщин концентрация рецепторов эстрадиола, по некоторым данным (Evans et al., 1974), была сниженной по сравнению с уровнем в пролиферативную фазу нормального цикла. Другие авторы обнаружили нормальный, свойственный пролиферативной фазе цикла уровень рецепторов эстрадиола в эндометрии при этой патологии. Почти все исследователи находят, что содержание рецепторов прогестерона в цитозоле при гиперплазии эндометрия варьирует в очень широких пределах. В среднем оно близко к их концентрации в пролиферативную фазу цикла, хотя у отдельных женщин наблюдаются очень высокие величины, значительно превышающие норму (Mac Laughlin, Richardson, 1976; Vihko et al., 1980). Эти данные свидетельствуют о преобладающем эстрогенном влиянии на ткань-мишень при гиперплазии эндометрия по сравнению с постменопаузальным периодом, хотя уровень гормонов при этом не всегда увеличен.

Остается неясным, какие изменения в рецепторном аппарате матки происходят при переходе от гиперпластического эпителия матки в неопластический. Большинство авторов отмечают при этом снижение среднего уровня цитозольных рецепторов, но возрастание ядерных рецепторов эстрадиола (Vihko et al., 1980; Neumanova et al., 1983). Имеются данные, что в хорошо дифференцированных опухолях уровень рецепторов эстрадиола значительно выше, чем в мало дифференцированных (Evans et al., 1974; Vihko et al., 1980). Содержание цитозольных рецепторов прогестерона при раке эндометрия значительно ниже, чем в норме, а иногда они полностью отсутствуют (Mac Laughlin, Richardson, 1976; Vihko et al., 1980). Для аденокарциномы эндометрия характерно снижение отношения уровня рецепторов прогестерона в цитозоле к содержанию ядерных рецепторов эстрадиола (King, Whitehead, 1980). Это, возможно, указывает на нарушение нормальной индукции прогестероновых рецепторов эстрадиолом при неопластических процессах эндометрия. Большой интерес представляют данные ряда авторов о том, что при наличии относительно высокого уровня рецепторов прогестерона в опухоли эндометрия достигается хороший терапевтический эффект лечением большими дозами прогестинов, тогда как при отсутствии или очень низком уровне рецепторов прогестерона гормональная терапия неэффективна. Но такая корреляция между уровнем рецепторов прогестерона и эффектом прогестинных препаратов в неопластических опухолях эндометрия менее тесная, чем это известно для уровня рецепторов эстрадиола и эффекта лечения эстрогенными препаратами злокачественных опухолей молочной железы.

Ряд работ посвящен изучению рецепторного аппарата половых гормонов в матке при ее доброкачественных новообразованиях. При эндометриозе отмечается ряд особенностей в рецепции эстрадиола по сравнению с нормальным эндометрием. По данным автораддиографии, рецепторы эстрадиола в эндометриальных очагах обнаружены как в эпителиальных клетках, так и в строме, тогда как в норме стромальные элементы не содержат рецепторов эстрадиола. В эндометриальных очагах отсутствует динамика концентрации рецепторов эстрадиола на протяжении цикла, которая хорошо выражена в клетках нормального эпителия (Gould et al., 1983). Биохимическое исследование выявило достоверные отличия физико-химических параметров эстроген-рецепторной системы (снижение K_d) при ретроцервикальном эндометриозе и увеличение количества ядерных рецепторов при всех формах этого заболевания (Алексеева и др., 1980). Таким образом, выявленные отличия в рецепторном аппарате эндометриальных очагов позволяют заключить, что при эндометриозе ткань-мишень, вероятно, по-иному отвечает на овариальные гормоны по сравнению с нормальным эндометрием.

При изучении рецепторов половых гормонов у женщин с фибромиомой матки в ткани опухоли обнаруживаются рецепторы половых гормонов. По нашим данным (совместно с Г. А. Савицким и Е. В. Секретаревой), в ткани миомы наблюдается та же динамика рецепторов эстрадиола и прогестерона по фазам цикла, что и в окружающем миометрии (рис. 2). Таким образом, миомная ткань отвечает на гормональные воздействия подобно нормальному миометрию. Физико-химические свойства рецепторов эстрадиола и прогестерона в миоме и миометрии не отличаются от нормы (Wilson et al., 1980), однако уровень рецепторов половых гормонов в миоме близок к их содержанию в эндометрии — активно пролиферирующей ткани, а не в миометрии. Большинство авторов отмечают, что в миомном узле, особенно быстро растущих опухолях, содержание рецепторов эстрадиола и прогестерона в цитозоле клеток выше, чем в окружающем миометрии (Василевская и др., 1979а, 1979б; Wilson et al., 1980). У отдельных больных, правда, наблюдается обратное соотношение, но в этих случаях, как показали наши данные, в опухоли преобладали соединительно-тканые элементы, не содержащие рецепторов, над миоидными клетками — носителями рецепторов. Причина, приводящая к увеличению содержания рецепторов половых гормонов в миомной ткани, остается неясной. Более высокий уровень рецепторов эстрадиола и прогестерона в миоме коррелирует с данными некоторых авторов о более интенсивном уровне обмена веществ в миоме, чем в миометрии, в частности, в миоме выше концентрация гликогена и активность синтезирующих его ферментов, чем в окружающем миометрии (Milwidsky, Gutman, 1983).

Значительно меньшее число исследований посвящено изучению уровня рецепторов половых гормонов при функциональных нарушениях полового цикла. Такие исследования наиболее трудны,

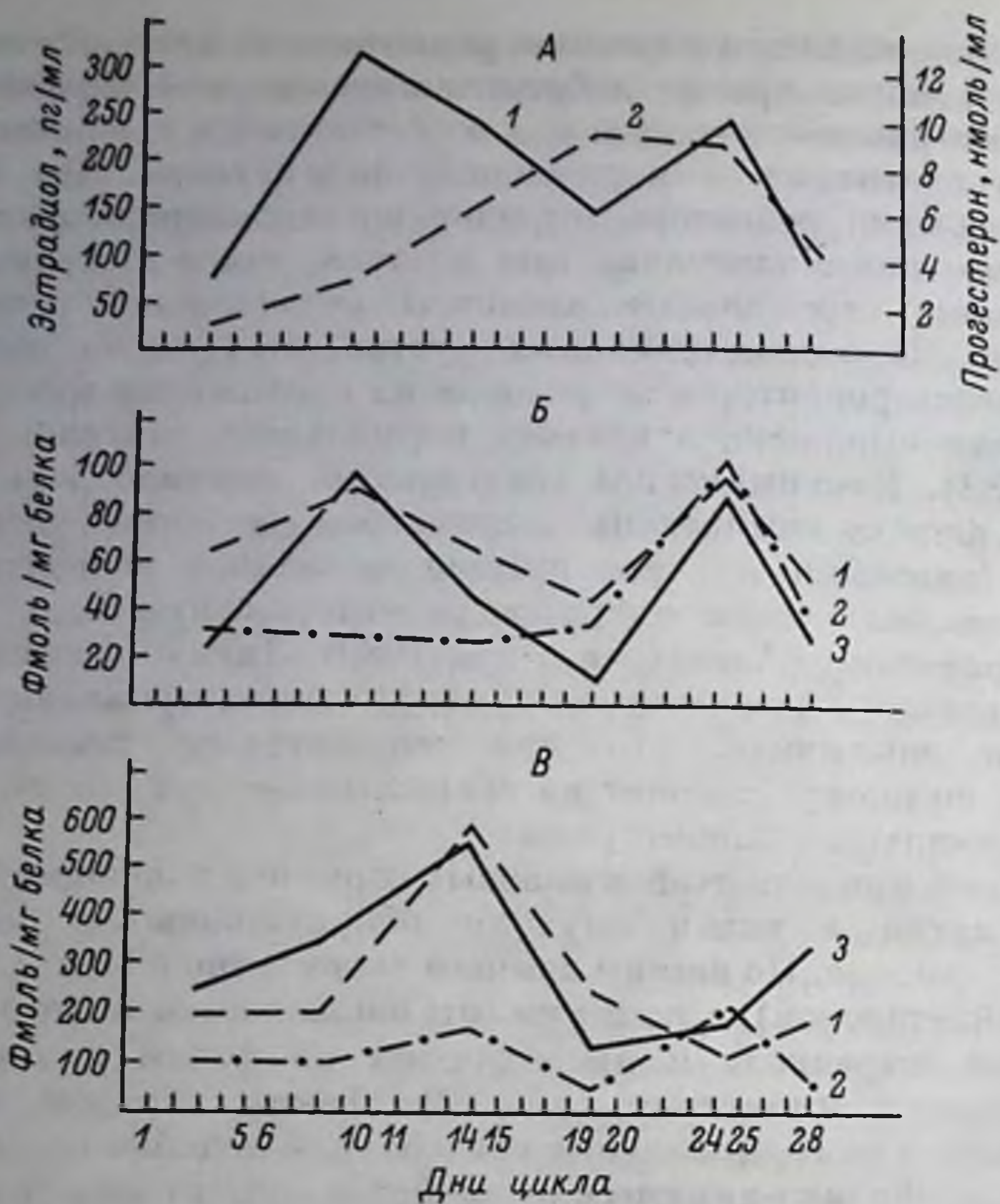


Рис. 2. Содержание половых стероидов (А) — эстрадиола (1) и прогестерона (2) в крови маточной вены и уровень рецепторов эстрадиола (Б) и прогестерона (В) в тканях матки у женщин с фибромиомой матки в зависимости от стадии менструального цикла.

На графиках Б и В: 1 — содержание рецепторов в эндометрии, 2 — в миометрии, 3 — в фиброматозном узле.

так как у этих больных сохраняется хотя и измененная по сравнению с нормой динамика половых гормонов в крови. Иногда при этом изменяется секреция андрогенов, кортикостероидов, пролактина и других гормонов, способных повлиять на рецепторный аппарат матки.

При ановуляторных циклах, характеризующихся снижением содержания эстрадиола в крови и отсутствием лютеинового увеличения секреции прогестерона, уровень цитозольных рецепторов эстрадиола в эндометрии в конце пролиферативной фазы остается таким же высоким, как в норме. Однако содержание ядерных рецепторов эстрадиола и прогестерона в этот период снижено, что, возможно, является следствием недостатка продукции эстрогенов. При неполноценности лютеиновой фазы цикла содержание рецепторов эстрадиола и прогестерона снижено, однако введением эстро-

генных препаратов удавалось нормализовать уровень рецепторов эстрадиола, концентрация же рецепторов прогестерона оставалась сниженной (Gautray et al., 1980).

При клинических исследованиях выявляется определенный контингент женщин, у которых неполноценность лютеиновой фазы цикла по результатам гистологических исследований обнаруживают при достаточно высоком содержании прогестерона, сохраняющемся в течение всей лютеиновой фазы. По нашим данным, это наблюдалось у женщин с фибромиомой, при бесплодии, при привычном недонашивании беременности (Арсеньева и др., 1973; Савченко и др., 1976). Хотя уровень рецепторов половых стероидов в этих работах не изучался, вполне возможно допустить наличие нарушения рецепции гормона у обследованных больных. Для того чтобы решить, являются ли наблюдаемые изменения уровней рецепторов половых гормонов в тканях матки первичными или они обусловлены нарушением секреции гормонов, требуются более детальные исследования. В этом отношении полезными могут быть и модельные опыты на животных.

Одной из распространенных моделей патологии эстрального цикла является неонатальная андрогенизация самок крыс. При выраженной андрогенизации у взрослых животных влагалище остается закрытым, при меньшей степени повреждения репродуктивной функции влагалище открывается, но ввиду отсутствия овуляции у них наблюдается постоянный эструс. По данным большинства авторов, у этих животных снижено содержание рецепторов эстрогенов в цитозоле и ядрах клеток матки (Резников, 1982). В наших исследованиях это было подтверждено биохимическим и автордиографическим методами (Орлов и др., 1983). Степень снижения эстрогеновой рецепции при этом зависела от выраженности синдрома неонатальной андрогенизации и была самой низкой у крыс с закрытым влагалищем (рис. 3).

Исследование ряда показателей, считающихся маркерами эстрогенного действия, показало, что у этих крыс снижена активность пероксидазы, но активность креатинкиназы и уровень рецепторов прогестерона в цитозоле клеток матки не изменен (рис. 3). Масса матки у них также находится в пределах, свойственных интактным самкам. Гомо- и гетероспецифическая регуляция уровня рецепторов эстрогенов и прогестерона в матке у неонатально андрогенизированных крыс имеет ту же направленность, что и у контрольных самок, но уровень рецепторов эстрадиола при стимуляции не достигает величин, характерных для нормальных крыс. В ответ на овариэктомию у андрогенизированных крыс не происходит увеличения цитозольных рецепторов эстрадиола, как это имеет место у нормальных животных. При этом у андрогенизированных крыс не наблюдается посткастрационной атрофии матки.

Указанные выше изменения рецепции половых стероидов маткой можно лишь частично связать с нарушением гормонального баланса у этих животных (снижение количества прогестерона и

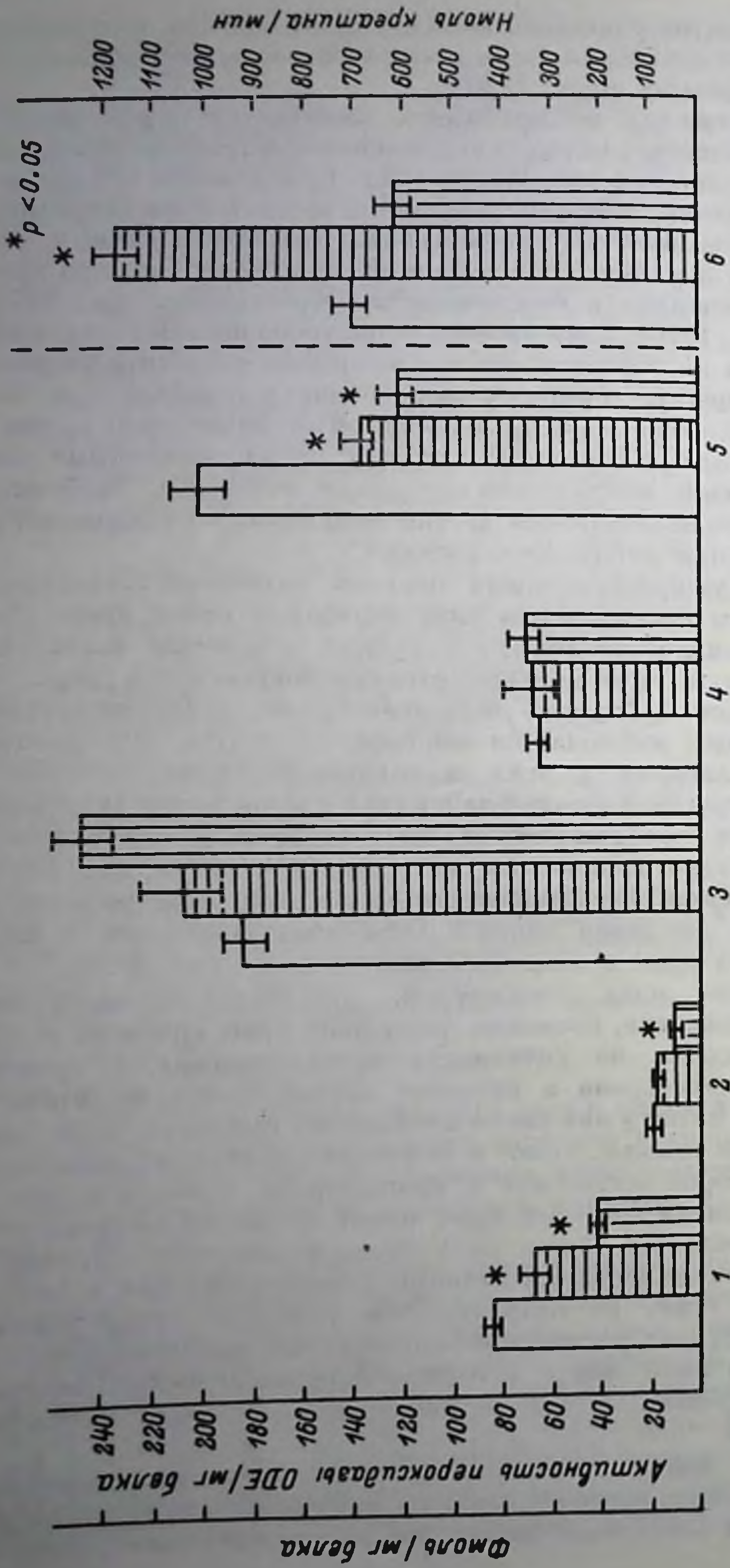


Рис. 3. Содержание рецепторов половых стероидов и уровень ферментов-маркеров эстрогенного влияния в матке андрогенизированных крыс в зависимости от степени повреждения репродуктивной функции

1 — рецепторы эстрадиола в цитозольной фракции, 2 — рецепторы эстрадиола в ядерной фракции, 3 — рецепторы прогестерона в цитозольной фракции («общие»), 4 — рецепторы прогестерона в цитозольной фракции (свободные), 5 — активность пероксидазы (в ортодоксиазидиновых единицах), 6 — активность креатинкиназы (в имоль креатинина/мин). Незащитованные столбики — контроль, столбики с горизонтальной штриховкой — андрогенизированные крысы с постоянным эструсом, столбики с вертикальной штриховкой — андрогенизированные крысы с закрытой вагиной. * — различие с контрольным уровнем значения величин рецепторного связывания (фмоль/мг белка) см. на соседней оси ординат.

сохранение постоянной концентрации эстрадиола на уровне верхней границы нормы).

Однако только этим нельзя объяснить наблюдаемые отклонения в рецепции эстрогенов, что подтверждается невозможностью довести уровень рецепторов до нормы введением половых стероидов и отсутствием посткастрационной атрофии как реакции на овариэктомию. Вероятно, неонатальная андрогенизация наряду с нарушением дифференцировки центральных нервных структур приводит к необратимому повреждению каких-то структур клеточного аппарата матки (вероятно, на уровне генома), ответственных за осуществление рецепторного процесса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Анализ современных данных по физиологии рецепции половых гормонов в матке показывает, что имеет место динамика уровня белков-рецепторов этих стероидов в цитоплазме и ядре, зависящая от величины продукции гормонов в организме.

Основные принципы регуляции уровня гормональных рецепторов, сформулированные на основании модельных опытов с однократным и многократным введением различных доз гормонов, в основном подтверждаются и при анализе динамики уровня рецепторов в различных физиологических и патологических состояниях. Но в то же время нужно отметить, что в этих исследованиях еще много неясного, особенно в отношении синергического и антагонистического действия гормонов.

Опыты на интактных животных часто не совпадают с результатами, полученными на овариэктомированных самках. Кроме того, следует иметь в виду, что разные ткани матки по-разному реагируют на одинаковые воздействия. Так, миометрий имеет значительно меньшее количество рецепторов гормонов, чем эндометрий. В ряде работ указано, что миометрий и эндометрий по-разному реагируют на увеличение уровня половых гормонов. Более того, поскольку эндометрий или миометрий также состоят из разных клеток, то при более тонком исследовании отмечается и различие реакций по индукции или подавлению уровня рецепторов половых гормонов в различных клеточных типах внутри этих тканей. Клетки стромы эндометрия оказались более чувствительны к индукции рецепторов эстрадиола, чем клетки поверхностного эпителия (Martel, Psychoyos, 1982).

Остается открытым вопрос о наличии рецепторов половых гормонов в соединительнотканых элементах миометрия. Даже не все однотипные клетки в ткани одинаково чувствительны к гормону. Авторадиографическое исследование показывает, что меченый гормон обнаруживается далеко не во всех клетках миометрия или эндометрия. Есть предположение, что это обусловлено физиологическим состоянием каждой клетки — фазой покоя, синтеза, активного деления (Conti et al., 1984). Возможно, что такие первичные посредники, как рецепторы гормонов, есть не во

всех клетках. Только отдельные клетки рецептируют гормональный сигнал и передают его в ядро, а другие клетки благодаря межклеточным контактам получают уже сигналы от вторичных посредников, образовавшихся в «первичных» клетках в ответ на гормональное воздействие.

Очень много еще неясно в отношении связи между уровнем рецепторов половых гормонов в цитозоле и ядре и характером метаболических ответов клеток. Большинство так называемых «маркеров» гормонального действия при более детальном рассмотрении оказывается зависимым не только от одного гормона. Кроме того, динамика уровня рецепторов эстрадиола или прогестерона в цитозоле или ядре не всегда соответствует выраженности метаболического эффекта. Так, основные метаболические эффекты прогестерона (активность дегидрогеназ, усиление или индукция биосинтеза специфических белков) разворачиваются в середине лютеиновой фазы, когда уровень не только цитозольных, но и ядерных рецепторов прогестерона уже значительно снижен. Это несоответствие особенно наглядно выступает при беременности: Давное физиологическое состояние вызывает резкую активацию обменных процессов, обуславливающую интенсивный рост матки, изменение ее физиологических параметров (снижение возбудимости, увеличение растяжимости органа). Между тем общий уровень рецепторов при этом не только не превышает величина их пика в преовуляторный период, но в отношении рецепторов эстрадиола остается даже значительно ниже его. Правда, при этом наблюдается резко отличное от небеременных животных перераспределение рецепторов — более 90 % их общего пула находится в ядре. При этом непонятно, как в данном случае происходит рециклизация цитоплазматических рецепторов, которые по существующей схеме являются первым звеном в принятии гормонального сигнала. Выяснение всех этих вопросов должно явиться предметом дальнейших исследований.

Л и т е р а т у р а

- Алексеева М. Л., Адомян Л. В., Стурчак С. В. и др. Особенности эстроген-рецепторной системы эндометрия при физиологических и некоторых патологических состояниях эндометрия. — Пробл. эндокринолог., 1980, т. 26, № 4, с. 26—28.
- Арсеньева М. Г., Савченко О. Н., Степанов Г. С. Реакция матки, слизистой влагалища и молочных желез на нарушение гормональной стимуляции при сохраненном ритме месячных. — В кн.: Тез. докл. 7-го Междунар. конгр. акуш. и гинекол. М., 1973, № 1015, с. 569.
- Баранов В. Г., Пропп М. В., Савченко О. Н. Влияние прогестерона на регуляцию полового цикла у старых крыс с постоянной течкой. — Пробл. эндокринолог., 1972, т. 18, № 3, с. 63—68.
- Василевская Л. Н., Бассалык Л. С., Кузьмина З. В. и др. Содержание прогестерона и его рецепторов у больных миомой матки. — В кн.: Миома матки. М.: Изд-во Моск. стоматол. ин-та, 1979а, с. 26—30.
- Василевская Л. Н., Бассалык Л. С., Муравьева Н. И., Фукс М. А. Рецепторы эстрогенов в миометрии больных миомой матки. — В кн.: Миома матки. М.: Изд-во Моск. стоматол. ин-та, 1979б, с. 22—25.

- Кауниге М. Биохимия старения. М.: Мир, 1982. 294 с.
- Мицкевич М. С. Гормональная регуляция в онтогенезе животных. М.: Наука, 1978. 194 с.
- Петрунин Д. Д., Пшеничникова Т. Я., Шевченко О. П. и др. Иммунохимическое исследование α_2 -микроглобулина фертильности в эндометрии. — Акуш. и гинекол., 1983, № 9, с. 27—29.
- Орлов М. М., Савченко О. Н., Скопичев В. Г., Проїмина Ф. И. Анализ специфического связывания H^3 -эстрадиола маткой андрогенстерильных крыс биохимическим и авторадиографическим методами. — Пробл. эндокринолог., 1983, т. 29, № 3, с. 77—82.
- Резников А. Г. Половые гормоны и дифференцировка мозга. Киев: Наукова думка, 1982. 250 с.
- Розен В. Б., Смирнов А. Н. Рецепторы и стероидные гормоны. М.: Изд-во МГУ, 1981. 310 с.
- Савченко О. Н., Рыжова Р. К., Степанов Г. С., Арсеньева М. Г. Сопоставление уровня половых гормонов с реакцией тканей мишеней при неполноценности лютеиновой фазы менструального цикла. — Вопр. охраны матер. и детства, 1976, № 10, с. 68—72.
- Сергеев П. В. Стероидные гормоны. М.: Наука, 1984. 340 с.
- Тофт Д., Моуджил В., Ломар Ф. Выделение и изучение свойств рецептора прогестерона. — В кн.: Взаимодействие гормонов с рецепторами. М.: Мир, 1979, с. 233—256.
- Юдаев Н. А., Асрибекова М. К., Каганович Б. Е. Рецепция половых гормонов в эндометрии человека при нормальной и патологической беременности. — Пробл. эндокринолог., 1976, т. 22, № 2, с. 36—39.
- Юдаев Н. А., Асрибекова М. К., Карпова С. К., Каганович Б. Е. Регулирование половыми гормонами содержания рецепторов прогестерона и эстрадиола в цитозоле эндометрия человека при нормальной и патологической беременности. — Пробл. эндокринолог., 1979, т. 25, № 3, с. 37—42.
- Юдаев Н. А., Асрибекова М. К., Карпова С. К., Мурашко Л. Е. Регулирование простагландинами содержания рецепторов половых гормонов в децидуальной ткани человека. — Пробл. эндокринолог., 1980, т. 26, № 6, с. 63—74.
- Affleck H. S., Keeping H. S., Newkombe A. M., Jellinck P. H. Distribution of estrogen-induced peroxidase in the rat uterus. — Acta endocrinol., 1981, vol. 98, p. 609—613.
- Alexandrova M., Soloff M. S. Oxytocin receptors and parturition. — Endocrinology, 1980, vol. 106, p. 730—738.
- Anderson I. N., Peck E. I., Clark J. H. Nuclear receptor-estrogen complex. — Endocrinology, 1973, vol. 92, N 5, p. 1488—1495.
- Anderson W. A., Trantalis J., Kang J. H. Ultrastructural localization of endogenous mammary gland peroxidase during lactogenesis in the rat. — J. Histochem. and Cytochem., 1975, vol. 23, N 4, p. 295—302.
- Barbanel G., Assenmacher J. Postnatal development of estradiol receptor in female rats. — Mol. and Cell. Endocrinol., 1980, vol. 18, N 3, p. 227—239.
- Baulieu E.-E., Wira C. R., Milgrom E., Raynaud-Jammet C. Ribonucleic acid synthesis and oestradiol action in the uterus. — Acta endocrinol., 1972, vol. 71, suppl. 168, p. 396—419.
- Bayard F., Damilano S., Robel P., Baulieu E.-E. Cytoplasmic and nuclear estradiol and progesterone receptors in human endometrium. — J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1978, vol. 46, N 4, p. 635—648.
- Bonney R. C., Reed M. J., James V. H. Inhibition of 17-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human endometrium by adrenal androgens. — J. Steroid Biochem., 1983, vol. 18, N 1, p. 59—64.
- Boomsa R. A., Jaffe R. C., Verhage H. G. The uterine progestational response in cats. — Biol. Reprod., 1982, vol. 26, N 3, p. 511—521.
- Chang W.-G., Roth G. S. Changes in the mechanisms of steroid action during aging. — J. Steroid Biochem., 1979, vol. 11, N 1, p. 889—892.
- Chilton B. S., Daniel J. C., Booher C. R. Induction of uterine protein synthesis by synthetic progestins. — Fertil. and Steril., 1977, vol. 28, N 3, p. 269—272.
- Ciocca D. R., Asch R. H., Adams D. J., McGuire W. L. Evidence for modulation of

- 24 K protein in human endometrium during menstrual cycle. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1983, vol. 57, N 3, p. 496—499.
- Conti J., Gimenez-Conti I. B., Conner E. A., et al., Estrogen and progesterone regulation of proliferation, migration and loss in different target cells of rabbit uterine epithelium. — *Endocrinology*, 1984, vol., 114, N 2, p. 345—351.
- Davies P., Syne J. S., Nicholson R. I. Effect of estradiol and the antiestrogen tamoxifen on steroid hormone receptor concentration and nuclear ribonucleic acid polymerase activities in the rat uterus. — *Endocrinology*, 1979, vol. 105, N 6, p. 1336—1342.
- Deaver P. R., Guthrie H. D. Cytoplasmic estrogen receptor, estradiol and progesterone concentrations in endometrium of nonpregnant and pregnant pigs. — *Biol. Reprod.*, 1980, vol. 23, N 1, p. 72—77.
- De Sombre E. R., Lyttle C. R. Steroid hormone regulation of uterine peroxydase activity. — In: *Steroid hormone receptor symp.* N. Y.; London: Acad. Press, 1979, p. 157—171.
- Dix C. J., Jordan V. C. Subcellular effects of monohydroxytamoxifen in the rat uterus. — *J. Endocrinol.*, 1980, vol. 85, N 2, p. 393—404.
- Dixon S. N., Gibbons R. A. Proteins in the uterine secretions of cow. — *J. Reprod. and Fertil.*, 1979, vol. 56, N 1, p. 119—127.
- Evans E. N., Martin J. D., Haehnel R. Estrogen receptor concentration in normal and pathological human uterine tissues. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1974, vol. 38, N 1, p. 23—32.
- Evans R. V., Leavitt W. W. Progesterone inhibition of uterine nuclear estrogen receptor. — *Proc. Nat. Acad. Sci USA*, 1980, vol. 77, p. 5856—5860.
- Ferguson E. R., Katzenellenbogen B. S. A comparative study of antiestrogen action. — *Endocrinology*, 1977, vol. 100, N 5, p. 1242—1251.
- Finlay T. H., Katz J., Kadner S., Levitz M. Properties of an estrogen-induced hydrolytic enzyme from mouse uterus. — *J. Steroid Biochem.*, 1983, vol. 19, N 1, 743—749.
- Fridlansky F., Milgrom E. Interaction of uteroglobin with progesterone, 5-pregnane-3, 20-dione and estrogens. — *Endocrinology*, 1976, vol. 99, N 5, p. 1244—1251.
- Gautry S. P., Mortel R., Robel P., Baulieu E. E. Uterine receptor and fertility regulation. — *Acta europae fertilitatis*, 1980, vol. 11, N 3, p. 185—198.
- Giambiagi N., Pasqualini J. R., Greene G., Jensen E. V. Recognition of two forms of the estrogen receptor in the guinea-pig uterus at different stages of development by monoclonal antibody to the human estrogen receptors. — *J. Steroid Biochem.*, 1984, vol. 20, N 1, p. 397—400.
- Giannopoulos G., Goldberg P., Shea T., Tulchinsky D. Unoccupied and occupied estrogen receptors in myometrial cytosol and nuclei from nonpregnant and pregnant women. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1980, vol. 51, N 4, p. 702—710.
- Giannopoulos G., Tulchinsky D. Cytoplasmic and nuclear progestin receptors in human myometrium during menstrual cycle and pregnancy at term. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1979, vol. 49, N 1, p. 100—106.
- Gould S. F., Shannon J. M., Cunha G. R. Nuclear estrogen binding site in human endometriosis. — *Fertil. and Steril.*, 1983, vol. 39, N 4, p. 520—524.
- Hamilton T. H., Clark J. U., Sadler W. A. Ontogeny of receptors and reproductive hormone action. N. Y., 1979. 572 p.
- Harmon J. R., Kimmel G. L. Estrogen receptor characterization following selective sedimentation separation of estrogen-binding components in immature rat uterine cytosol. — *J. Receptor Res.*, 1981—1982, vol. 2, N 5—6, p. 555—574.
- Ichida S., Tokunaga H., Oda Y. et al. Increase of serotonin receptors in rat uterus induced by estradiol. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, N 22, p. 13438—13443.
- Illingworth D. V., Wood G. P., Flikinger G. L., Mikhail G. Progesterone receptors of the human myometrium. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1975, vol. 40, N 6, p. 1001—1008.
- Jacobelli S., Marchetti P., Bartoccioni E. et al., Steroid-induced proteins in human endometrium. — *Mol. and Cell. Endocrinol.*, 1981, vol. 23, N 4, p. 321—331.
- Jänne O. A. Progesterone action in mammalian uterus. — *Acta obstetr. gynec. scand.* 1981, vol. 60, suppl. 101, p. 11—16.
- Jellinck P. H., Affleck A., Newcombe A. M. Estrogen-androgen interaction. — *Canad. J. Biochem. and Cell. Biol.*, 1983, vol. 61, N 7, p. 779—783.

- Jellinck P. H., Newcombe A. M., Keeping H. S. Peroxidase as a marker enzyme in estrogen-responsive tissues. — *Adv. in Enzyme Reg.*, 1979, vol. 17, N 3, p. 325—342.
- Joshi S. G. A progestagen-associated protein of the human endometrium. — *J. Steroid Biochem.*, 1983, vol. 19, N 1, p. 751—757.
- Joshi S. G., Ebert K. M., Swartz D. P. Detection and synthesis of a progestagen-dependent protein in human endometrium. — *J. Reprod. and Fertil.*, 1980, vol. 59, N 2, p. 273—285.
- Ju Winston C. N., Leung B. S. Variation of cytoplasmic content of estrogen and progesterone receptors in the mammary gland and uterus of rats at time of parturition. — *Biol. Reprod.*, 1982, vol. 27, N 3, p. 656—664.
- Jungblut P. W., Kallwelt E., Sierralta W. et al. Estradiol and progesterone receptor content of uterine nuclei from ovariectomized/adrenalectomized pigs. — *Acta endocrinol.*, 1978, vol. 87, suppl. 215, p. 136—137.
- Katz J., Kardner S., Levitz M. Uterine hydrogen peroxide concentration and peroxidase activities in the cycle and perimaturation period of mice. — *Endocrinol. Res. Commun.*, 1982, vol. 9, N 1, p. 47—54.
- Katzenellenbogen B. S. Synthesis and inducibility of uterine estrogen-induced protein, IP, during the rat estrous cycle to uterine estrogen sensitivity. — *Endocrinology*, 1975, vol. N 2, p. 289—297.
- Katzenellenbogen B. S., Ferguson E. R., Lan N. C. Fundamental differences in action of estrogens and antiestrogens on the uterus. — *Endocrinology*, 1977, vol. 100, N 6, p. 1252—1259.
- Keeping H. S., Lyttle C. R. Modulation of rat uterine progesterone receptor levels and peroxidase activity by tamoxifen citrate and estradiol. — *Endocrinology*, 1982a, vol. 111, N 6, 2046—2054.
- Keeping H. S., Lyttle C. R. Regulation of uterine steroid receptor levels and peroxidase activity during puerperium of the nonlactating rat. — *Biol. Reprod.*, 1982b, vol. 27, N 6, p. 1011—1022.
- King R. J. B., Whitehead M. J. Application of steroid receptor analyses to clinical and biological investigations of the postmenopausal endometrium. — In: *Perspectives in steroid receptor research*. N. Y.: Raven Press, 1980, p. 259—271.
- Kokko E., Jänne O., Kaupilla A., Vihko R. Cyclic clomiphene citrate treatment lowers cytosol estrogen and progesterone receptor concentrations in endometrium of postmenopausal women on estrogen therapy. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1981, vol. 52, N 2, p. 345—349.
- Koligian K. B., Stormshak F. Progesterone inhibition of estrogen receptor replenishment in ovine endometrium. — *Biol. Reprod.*, 1977, vol. 17, N 3, p. 412—416.
- Kreitmann B., Bayard F. Oestrogen and progesterone receptor concentrations in human endometrium during gestation. — *Acta endocrinol.*, 1979, vol. 92, N 3, p. 547—552.
- Kreitmann B., Bugat R., Bayard F. Estrogen and progestin regulation of the progesterone receptor concentration in human endometrium. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1979, vol. 49, N 6, p. 926—929.
- Lantta M., Kärkäinen J., Lehtovirta P. Progesterone and estradiol receptors in the cytosol of the human uterine artery. — *Amer. J. Obstet. and Gynecol.*, 1983, vol. 147, N 6, p. 627—636.
- Loosfelt H., Fridlansky F., Savouret J. F. et al. Mechanism of action of progesterone in the rabbit endometrium. — *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, N 7, p. 3465—3470.
- Mac Laughlin D. T., Richardson G. S. Progesterone binding by normal and abnormal human endometrium. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1976, vol. 42, N 4, p. 667—678.
- Mairesse N., Galand P. Non-histone chromosomal proteins in estrogen-treated rat uterus. — *J. Steroid Biochem.*, 1980, vol. 12, N 1, p. 299—301.
- Malnick S. D. H., Shaer A., Soreg H., Kaye A. M. Estrogen-induced creatine kinase in the reproductive system of the immature female rat. — *Endocrinology*, 1983, vol. 113, N 5, p. 1907—1909.
- Manak R., Wertz N., Slabanck M. et al. Purification and characterization of the estrogen-induced protein (IP) of the rat uterus. — *Mol. and Cell. Endocrinol.*, 1980, vol. 17, p. 119—132.
- Manni A., Baker R., Arafah B. M., Pearson O. H. Uterine oestrogen and progesterone

- receptors in the ovariectomized rat. — *J. Endocrinol.*, 1981, vol. 91, N 2, p. 281—287.
- Martel D., Psychoyos A.** Different responses of rat endometrial epithelium and stroma to induction of oestradiol binding sites by progesterone. — *J. Reprod. and Fertil.*, 1982, vol. 64, N 2, p. 387—389.
- Milgrom E., Atger M., Perrot M., Baulieu E.** — Progesterone in uterus and plasma. — *Endocrinology*, 1972, vol. 9, N 4, p. 1071—1078.
- Miller B. G., Murphy L., Stone G. M.** Hormone receptor levels and hormone, RNA and protein metabolism in the genital tract during the estrous cycle of the ewe. — *J. Endocrinol.*, 1977, vol. 73, N 1, p. 91—98.
- Milwidsky A., Gutman A.** Glicogen metabolism of normal human myometrium and leiomyoma — possible hormonal control. — *Gynecol. Obstet. Invest.*, 1983, vol. 15, N 3, p. 147—152.
- Moulton B. C.** Progesterone and estrogen control of the response of rat uterine lysosomal cathepsin D activity to a decidualogenic stimulus. — *Endocrinology*, 1981, vol. 110, N 4, p. 1197—1202.
- Neumannova M., Kauppila A., Vihko R.** Cytosol and nuclear estrogen and progestin receptors and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity in normal and carcinomatous endometrium. — *Obstet. Gynecol.*, 1983, vol. 61, N 2, p. 181—188.
- Pino A. M., Devoto L., Soto E. et al.** Changes in cytosolic and nuclear estradiol receptors of normal fallopian tube throughout the menstrual cycle. — *J. Steroid Biochem.*, 1982, vol. 16, N 1, p. 193—197.
- Quirk S. M., Currie W. B.** Uterine steroid receptor changes associated with progesterone withdrawal during pregnancy and pseudopregnancy in rabbits. — *Endocrinology*, 1984, vol. 114, N 1, p. 182—191.
- Reiss N. A., Kaye A. M.** Identification of the major component of the estrogen-induced protein of the rat uterus as BB isozyme of creatine kinase. — *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 265, N 3, p. 5741—5748.
- Richardson G. S., Lauglin D. T., Mac Bradley F. M., McCully W. S.** In vivo and in vitro the human endometrium secretes specific proteins in response to progestational stimulation. — *Fertil. and Steril.*, 1984, vol. 41, N 2, p. 809—812.
- Ruh T. S., Baudendistel L. J.** Different nuclear binding sites for antiestrogen and estrogen receptor complexes. — *Endocrinology*, 1977, vol. 100, N 2, p. 420—427.
- Rutanen E. M., Koistinen R., Wahlström T., Sjöberg J., Stenman U. N., Seppälä M.** Placental protein 12 (PP-12) in the human endometrium. — *Brit. J. Obstet. Gynecol.*, 1984, vol. 91, N 4, p. 377—381.
- Saiduc .in S., Zassenhaus P.** Estrous cycle, decidual cell response and uterine estrogen and progesterone receptor in Fisher 344 virgin aging rats. — *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1979, vol. 161, N 1, p. 119—124.
- Sanborn B. M., Kuo H. S., Held B.** Estrogen and progestagen binding site concentrations in human endometrium and cervix throughout the menstrual cycle and in tissues from women taking oral contraceptives. — *J. Steroid Biochem.*, 1978, vol. 9, N 10, p. 951—955.
- Satyaswaroop P. G., Mortel R.** Creatine kinase activity in human endometrium. — *Amer. J. Obstet. Gynecol.*, 1983, vol. 146, N 2, p. 159—162.
- Schmidt-Gollwitzer M., Eiletz J., Genz T., Pollow K.** Determination of estradiol, estrone and progesterone in serum and myometrium. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1979, vol. 49, N 3, p. 370—376.
- Schrader W. T., O'Malley B. W.** Structure of chick progesterone receptors. — *Cancer Res.*, 1978, vol. 38, p. 4199—4203.
- Schrader W. T., Seleznev J., Vedeckis W. V., O'Malley B. W.** Steroid receptor subunit structure. — In: *Gene regulation by steroid hormones*. N. Y.; Heidelberg; Berlin; Springer Verlag, 1980, p. 78—88.
- Segal S. E., Koide S. S.** Molecular Pharmacology of estrogens. — In: *Pharmacology of estrogens*. N. Y.: Pergamon Press, 1981, p. 113—151.
- Simuda C., Pasqualini J. R.** Regulation of estrogen action in the uterus of guinea-pig fetus. — *J. Steroid Biochem.*, 1981, vol. 15, N 1, p. 137—143.
- Strinden S. T., Shapiro S. S.** Progesterone-altered secretory proteins from cultured human endometrium. — *Endocrinology*, 1983, vol. 112, N 3, p. 862—870.
- Takebisa T.** Lactate dehydrogenase in human cervical mucus. — *Fertil. and Steril.*, 1980, vol. 33, N 2, p. 135—140.

- Tarachand U., Eapen J. Influence of estrogen, progesterone and oestrous cycle on γ -glutamyltranspeptidase of rat endometrium. — *FEBS Lett.*, 1982, vol. 141, N 2, p. 210—212.
- Tchernitchin Q. N., Galand P. Estrogen levels in the blood, not in the uterus determine uterine eosinophilia. — *J. Endocrinol.*, 1983, vol. 99, N 1, 123—130.
- Thampan T. N. R., Clark J. H. An estrogen receptor activator protein in rat uterine cytosol. — *Nature*, 1981, vol. 290, p. 152—154.
- Trevoux R. Dosages des récepteurs des estrogènes et de la progestérone au niveau del endomètre dans la peri-menopause. — *Ginécologie*, 1983, vol. 34, N 6, p. 511—513.
- Tseng L., Gurpide E. Stimulation of various 17β - and 20α -hydroxysteroid dehydrogenase activities by progestins in human endometrium. — *Endocrinology*, 1979, vol. 104, N 6, p. 1745—1748.
- Tucker E. B., Schultz G. H. Temporal changes in proteins of oviduct and uterine fluids during the preimplantation period in the rabbit. — *Biol. Reprod.*, 1977, vol. 17, p. 749—759.
- Vaughan M. K., Buchman J., Blask D. E. et al. Diurnal variation in uterine estrogen receptors in immature rats — inhibition by arginine vasotocin. — *Endocrine Res. Commun.*, 1979, vol. 6, N 3, p. 191—201.
- Vertes M., Kornnyei J., Nagy L. et al. Stimulation by oestradiol of soluble-protein synthesis in rat hypothalamus. — *Mol. and Cell. Endocrinol.*, 1981, vol. 22, p. 329—338.
- Vihko R., Jänne O., Kaupilla A. Steroid receptors in normal, hyperplastic and malignant human endometrium. — *Ann. Clin. Res.*, 1980, vol. 12, p. 208—215.
- Vu Hai M. J., Logeat P., Milgrom E. Progesterone receptors in the rat uterus, variations in cytosol and nuclei during the oestrous cycle and pregnancy. — *J. Endocrinol.*, 1978, vol. 76, N 1, p. 43—48.
- Walters M. R., Clark J. H. Cytosol and nuclear compartmentalisation of progesterone receptors in the rat uterus. — *Endocrinology*, 1978, vol. 103, N 2, p. 601—608.
- Walters M. R., Clark J. H. Relationship between the quantity of progesterone receptor and the antagonism of estrogen-induced uterotrophic response. — *Endocrinology*, 1979, vol. 105, N 2, p. 382—386.
- Wilson E. A., Yang F., Rees E. D. Estradiol and progesterone binding in uterine leiomyomata and normal uterine tissues. — *Obstet. and Gynecol.*, 1980, vol. 55, N 1, p. 20—24.
- Zava D. T., McGuire W. L. Androgen action through estrogen receptor in human breast cancer. — *Endocrinology*, 1978, vol. 103, N 2, p. 624—631.

Глава 5

ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕЦЕПЦИИ АНДРОГЕНОВ

Мужские половые гормоны представлены группой C_{19} -стероидов — производных андростана. Широкий диапазон физиологического действия сочетается в них с высокой избирательностью и специфичностью. Андрогены контролируют половое развитие млекопитающих, процессы репродукции, сперматогенез, сексуальное поведение, секрецию гонадотропинов, синтез белка в печени, костях и мышцах, влияют на биохимические процессы в почках, кроветворение, рост волос, секрецию кожного сала и т. п.

Некоторые свойства андрогенов не являются уникальными. Например, выраженной анаболической активностью обладают эстрогены. Вместе с тем такие специфические андрогенные эффекты, как появление в онтогенезе вторичных мужских половых признаков, способность стимулировать предстательную железу и семенные пузырьки, присущи только андрогенам.

Прием гормонального сигнала, инициация и реализация физиологического действия андрогенов в клетках-мишенях осуществляются по универсальному пути, который в большинстве случаев включает в себя в качестве основных этапов рецепцию гормонов и взаимодействие гормон-рецепторных комплексов с генетическим материалом ядра (Мейнуоринг, 1979; Розен, Смирнов, 1981). Разнообразие же физиологических ответов на андрогенные воздействия зависит прежде всего от тканевой и органной специфичности, т. е. от конкретной структурно-функциональной организации андрогензависимых и андрогенчувствительных органов и тканей.

Но даже в одном и том же органе андрогены могут обуславливать разные по характеру физиологические сдвиги. Эта поливекторность (мультипотентность) действия мужских половых гормонов становится понятной, если принять во внимание, с одной стороны, множественность форм андрогенных циторецепторов, с другой — разветвленность путей метаболизма андрогенов с образованием биологически активных продуктов.

НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕЦЕПЦИИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЗМА АНДРОГЕНОВ

Первоначальные представления о тестостероне как главном мужском половом гормоне уступили место концепциям функционального метаболизма, в которых тестостерону отводится роль прогормона. Действительно, 5α -дигидротестостерон, биологически активный метаболит тестостерона, значительно превышает своего предшественника по андрогенной активности.

По данным Мейнуоринга (1979), после введения крысам ^3H -тестостерона свыше 80 % трития, связанного с цитоплазматической и ядерной фракциями предстательной железы, обнаруживается в составе ^3H - 5α -дигидротестостерона. Большинство известных проявлений физиологического действия тестостерона обусловлено влиянием 5α -дигидротестостерона на экспрессию генов в клеточных ядрах органов-мишеней.

В цитоплазме клеток предстательной железы по меньшей мере 8 андрогенных соединений могут превращаться в дигидротестостерон (Bruchovsky, 1980). По-видимому, для 3α - и 3β -андростендиолов этот этап является обязательным, чего, однако, нельзя сказать о тестостероне. Мейнуоринг (1979) и другие (Liao, 1977) приводят интересную сводку данных об эффектах тестостерона, неопосредованных 5α -дигидротестостероном. К ним, в частности, относится стимуляция желез эндометрия крысы, влияние тестостерона на половое поведение у некоторых видов животных, индукция ановуляторного бесплодия у неонатально андрогенизированных самок крыс, дифференциация вольфовых протоков, а также, по-видимому, анаболические эффекты в скелетных мышцах. В мышцах и печени кастрированных крыс только 0.3 % радиоактивности введенного ^3H -тестостерона ассоциируется с 5α -дигидротестостероном (Tveter et al., 1971).

Имеются сведения о физиологической роли 5β -дигидротестостерона — метаболита, опосредующего влияние тестостерона на костный мозг и печень. В механизмах влияния тестостерона на половое поведение у взрослых животных и дифференциацию мозга по мужскому типу в раннем онтогенезе важное место отводится ароматическим превращениям андрогена в нервной ткани, ведущим к образованию эстрогенов (Резников, 1982). Следует упомянуть и о таком факте, как индукция активности β -глюкуронидазы в почках мышей 5α -андростандиолами, которые также образуются в результате метаболизма тестостерона.

Важнейшей характеристикой органа-мишени является способность избирательно поглощать и удерживать гормон. Внутриклеточный метаболизм тестостерона не отражается на этом интегральном показателе, когда изучается распределение в организме меченого тестостерона с высокой удельной радиоактивностью, поскольку при этом суммируется радиоактивность гормона и его метаболитов. Однако параметры специфического связывания в компартаментах клеток-мишеней различных органов тесно кор-

релируют с особенностями метаболической трансформации тестостерона. Так, цитозольные рецепторы вентральной простаты, семенных пузырьков, эпидидимиса обнаруживают значительно более высокое сродство к 5 α -дигидротестостерону, чем к тестостерону. В то же время в почках, матке, слюнных железах наблюдается противоположная картина, что соответствует сказанному выше о низком уровне превращения тестостерона в его 5 α -восстановленный метаболит в этих органах (Altramadal et al., 1976).

Общее связывание тестостерона (включая неспецифическое) цитоплазматической фракцией клеток предстательной железы крысы не превышает 25 % аналогичного показателя для 5 α -дигидротестостерона, а сродство тестостерона к андрогенным рецепторам цитоплазмы не достигает и десятой доли сродства 5 α -дигидротестостерона. Захват, накопление и удерживание тестостерона в цитоплазме клеток добавочных мужских половых желез в значительной степени обеспечивается андрогенсвязывающим белком, который по ряду признаков не может быть идентифицирован как рецептор. Между тем неспособность 5 α -дигидротестостерона и других метаболитов тестостерона воспроизводить вызываемое тестостероном усиление секреции эндометриальных желез крыс позволяет допустить существование специфической тестостерон-рецепторной системы (Giannopoulos, 1973).

Способность образовывать комплексы с 5 α -дигидротестостероном присуща двум компонентам растворимой цитоплазматической фракции крысиной простаты — α -белку и β -белку (Liao, 1977). Соответственно образуются комплексы I и II, биологическая функция которых различна. Судя по специфичности связывания с 5 α -дигидротестостероном и степени сродства к нему, по способности удерживаться в ядре и взаимодействовать с конкурентным антагонистом андрогенов — ципротеронацетатом, истинным рецепторным белком для 5 α -дигидротестостерона является β -белок. Ядерное связывание 5 α -дигидротестостерона может быть модифицировано α -белком, так что не исключено значение последнего как регулятора транслокации андроген-рецепторного комплекса в ядро.

Комплекс II образуется также при взаимодействии 5 α -дигидротестостерона и 5 α -андростандиола с микросомной фракцией предстательной железы крыс (Banlicu et al., 1971). Обнаруженный на мембранах эндоплазматической сети рецептор оказался идентичным β -белку растворимой цитоплазматической фракции. Принципиальное значение этого факта состоит в том, что он дает возможность объяснить внеядерные эффекты андрогенов, осуществляемые на уровне трансляционного этапа синтеза белка (например, индукция β -глюкуронидазы в почках мышей, которая локализована в микросомах).

Особенностью андроген-рецепторного аппарата в печени и клетках костного мозга является наличие рецепторных белков, которые обнаруживают большее сродство к 5 β -дигидротестостерону, чем к его 5 α -эпимеру.

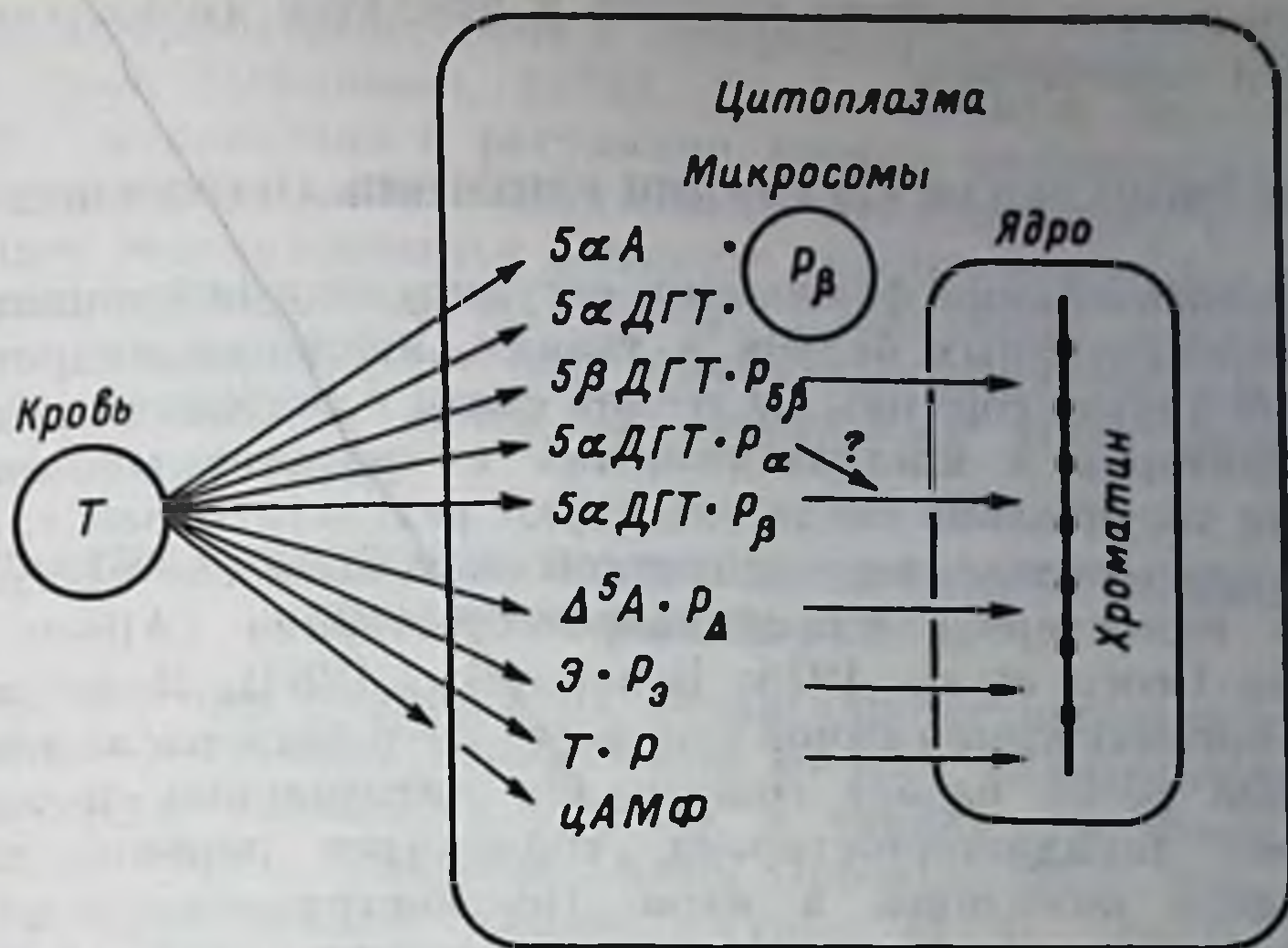


Рис. 1. Метаболизм тестостерона и цитоплазматические рецепторы андрогенов в клетке-мишени.

$5\alpha A$ — 5α -андростандиолы; $5\alpha ДГТ$ — 5α -дигидротестостерон; $5\beta ДГТ$ — 5β -дигидротестостерон; $\Delta^5 A$ — Δ^5 -андростендиол; Э — эстрогены; Т — тестостерон. P_β , $P_{5\beta}$, P_Δ , P_Σ — рецепторные белки цитоплазмы; P_α — андрогенсвязывающий α -белок. цАМФ — циклический 3',5'-аденозинмонофосфат, опосредующий некоторые андрогенные ответы без участия рецепторной системы.

Итак, мы видим, что гетерогенность андрогенсвязывающих белков в органах-мишенях соответствует разветвленности путей функционального метаболизма андрогенных стероидов (рис. 1). Причем в составе рецепторных белков преобладает та популяция, которая позволяет наиболее полно реализовать биологическое действие гормона или его метаболита, занимающего центральное место в андрогенной регуляции деятельности клетки-мишени.

Цитоплазматические рецепторы обеспечивают перенос андрогенов в ядро. Транслокации гормон-рецепторного комплекса в ядро предшествует конформационная перестройка рецепторных белков. Андрогенные рецепторы ядерной фракции отличаются по физико-химическим свойствам от цитоплазматических. Биологическое действие большинства андрогенов определяется их взаимодействием с акцепторными участками хроматина ядра (см. рис. 1).

Вопрос о роли внутриядерных процессов в реализации гормональной активности неметаболизированного тестостерона еще не решен окончательно. Следует, однако, принять во внимание данные об удерживании тестостерона хроматином ядер культуры костного мозга крыс (Minguell, Valladares, 1974). Если отвергнуть концепцию о биологическом значении взаимодействия тестостерон-рецепторного комплекса с хроматином ядра, трудно представить себе механизмы, посредством которых тестостерон, минуя стадию образования 5α -дигидротестостерона, осуществляет в ходе развития плода такие глубокие морфогенетические преобразования, как

дифференциация вольфова протока в придаток яичка, семенной пузырек и семяпровод.

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ РЕЦЕПЦИИ АНДРОГЕНОВ

Физиологическими факторами, регулирующими концентрацию андроген-рецепторных белков в тканях, являются андрогены и некоторые другие гормоны. О тесной связи содержания андрогенных рецепторов в клетках-мишенях с андрогенным статусом организма убедительно свидетельствуют результаты работ, в которых изучалось поведение рецепторной системы после кастрации и введения тестостерона или дигидротестостерона (Alison et al., 1975; Van Doorn et al., 1976; Bruchovsky, 1980). В добавочных половых органах крыс самцов уже через 2—6 дней после удаления семенников резко падает содержание цитозольных и ядерных рецепторов дигидротестостерона, тормозится перенос гормон-рецепторного комплекса в ядро. Посткастрационная атрофия семенных пузырьков и коагулирующих желез мышцы сопровождается нарастающим снижением поглощения меченых андрогенов. Столь быстрое исчезновение рецепторных белков объясняют активацией протеолитических процессов в клетках-мишенях. На фоне заместительного введения тестостерона и дигидротестостерона кастрированным животным происходит восстановление рецепторного аппарата предстательной железы крыс. Введение 5α -дигидротестостерона стимулирует транслокацию андроген-рецепторного комплекса в ядро клетки. Но самое примечательное состоит в том, что спустя длительное время после кастрации содержание андрогенных рецепторов в простате спонтанно увеличивается даже без дополнительного введения андрогенов. Это позволило постулировать (Sullivan, Strott, 1973) существование андрогеннезависимого механизма регуляции связывания мужских половых гормонов.

По поводу гомоспецифической регуляции, т. е. саморегуляции рецепции андрогенов уровнем этих гормонов, Розен и Смирнов (1981) высказывают предположение, что содержание рецепторов зависит не столько от концентрации андрогенов, сколько от активности протекания ростовых процессов в тканях.

Были представлены интересные данные об андрогенной регуляции андрогенсвязывающих компонентов цитоплазмы и ядра придатка семенника крысы (Tezon, Vlaquier, 1983). Авторы пришли к выводу о гетерогенности цитоплазматических рецепторов и их специфической зависимости от андрогенной насыщенности организма. По данным этих авторов, увеличение протеолитической активности цитоплазмы не является ведущим фактором в драматическом уменьшении количества рецепторных участков после кастрации.

О гетероспецифической регуляции андрогенных рецепторов известно пока очень мало. Заслуживают внимания данные, свидетельствующие о способности пролактина *in vitro* усиливать связы-

вание 5 α -дигидротестостерона с циторецепторами предстательной железы крыс (Johansson, 1976). На возможную роль гормона эпифиза — мелатонина в регуляции уровня андрогенных рецепторов крысиной простаты указывают исследования, в которых этот вопрос рассматривается в аспекте участия эпифиза в половом созревании (Moeller et al., 1983). Дальнейшие исследования в области гетероспецифического гормонального контроля рецепции андрогенов являются одной из актуальных задач физиологии эндокринной системы.

УЧАСТИЕ РЕЦЕПТОРОВ АНДРОГЕНОВ В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ ГОРМОНАЛЬНЫХ ЭФФЕКТОВ

Циторецепторы тестостерона, 5 α -дигидротестостерона и других андрогенных стероидов обнаружены во всех андрогензависимых и андрогенчувствительных органах и тканях — в мозге (Kato, 1974; Naess, 1976), гипофизе (Kato, Onouchi, 1973; Naess et al., 1975a), предстательной железе (Tvetter et al., 1971; Rennie, Bruchovsky, 1972; Ichii, 1975), семенниках (McLean et al., 1976), эпидидимисе (Tezon et al., 1982), матке (Юдаев, Асрибекова, 1974), сердце (McGill, 1980), скелетных мышцах (Max, 1981, 1983; Степанов, 1984), печени (Bardin, Catterall, 1981), почках (Tremblay et al., 1983) и др. Описанные андрогенсвязывающие компоненты клеток-мишеней отнесены к циторецепторам по принципу специфичности и высокого сродства к гормону-лиганду. Между тем рецептор — это «внутриклеточный компонент, скорее всего, белкового происхождения, ответственный за специфическое связывание с высоким сродством определенного стероидного гормона и участвующий в механизме действия последнего в качестве неотъемлемого компонента» (Мейнуоринг, 1979, с. 15). Вторая половина приведенного определения требует доказательства опосредующей роли обнаруженного рецепторного белка в реализации биологических эффектов андрогенов. Само по себе присутствие в органах-мишенях молекул, обладающих большим сродством к андрогенам, не может служить достаточным основанием для того, чтобы считать их истинными рецепторами. Поэтому целесообразно рассмотреть некоторые факты, подтверждающие физиологическую значимость этих белков.

Наиболее убедительный аргумент в пользу физиологической роли цитоплазматических рецепторных белков состоит в том, что без их участия невозможен активный перенос андрогенов из цитоплазмы в ядро клетки и воздействие гормонов на транскрипционный процесс, что является основой большинства гормональных эффектов. Функциональная роль ядерных рецепторов подтверждается специфическим акцептированием андроген-рецепторных комплексов хроматином ядра. В бесклеточных системах ни гормон, ни рецепторный белок сами по себе не усиливают РНК-синтезирующую активность хроматина, в то время как одновременное присутствие этих двух компонентов инициирует данную реакцию.

Значительный интерес могло бы представить сопоставление концентрации рецепторных участков в клетках-мишенях с уровнем чувствительности к андрогенам. В целом органы, располагающие развитой андроген-рецепторной системой (простата, семенные пузырьки), демонстрируют более высокий уровень реактивности к мужским половым гормонам, чем, например, миокард, печень или кора головного мозга. Но следует иметь в виду, что подобный сравнительный анализ крайне затруднителен из-за гетерогенности клеточного состава упомянутых органов и различного относительного содержания в них андрогенчувствительных клеток.

Гормональная активность природных и синтетических андрогенов отчетливо зависит от их сродства к циторецепторам. Так, уровень ассоциации некоторых метилированных производных 19-нортестостерона с цитоплазматическими рецепторами предстательной железы в 2—3.5 раза превышает этот показатель для 5 α -дигидротестостерона, что соответствует повышенной андрогенной активности этих стероидных аналогов. Корреляция между биологической активностью и сродством к рецепторам отмечена также в группе дериватов 5 α -дигидротестостерона (см. обзор: Мейнуоринг, 1979). Некоторые авторы (Toth, Zakar, 1982) убедительно показали зависимость миотропной активности тестостерона, 19-нортестостерона и их 5 α -восстановленных метаболитов от сродства к андрогенным рецепторам семенных пузырьков. По мнению этих исследователей, эффекты стероидов в семенных пузырьках и бульбокавернозной мышце опосредуются качественно идентичными рецепторами. Дифференциация же андрогенных и анаболических реакций происходит на уровне метаболизма тестостерона: процесс 5 α -восстановления в первом случае протекает гораздо интенсивнее.

Ключевая роль клеточных рецепторов в реализации действия мужских половых гормонов подтверждается анализом временных отношений между динамикой рецепции и проявлениями андрогенных эффектов. Увеличение концентрации цитоплазматических рецепторов 5 α -дигидротестостерона и усиление транслокации гормон-рецепторных комплексов в ядро опережают во времени стимулирующее влияние андрогенов на функциональную активность и пролиферацию клеток добавочных половых органов. В период эмбрионального развития возникновение андрогенсвязывающих локусов непосредственно предшествует появлению чувствительности тканей к морфогенетическому действию андрогенов.

Индукция синтеза цитоплазматических и ядерных андроген-рецепторных белков в раннем онтогенезе находится под контролем гена, ассоциированного с X-хромосомой (Ohno, 1977). Дифференциация же зачатка эмбриональных гонад в семенники детерминирована Y-хромосомой. Тестикулярные андрогены в определенных пределах регулируют содержание преформированных рецепторов и, следовательно, чувствительность органов-мишеней к мужским половым гормонам.

Результаты многочисленных экспериментальных исследований свидетельствуют об участии рецепторов андрогенов в регуляции полового созревания. Так, связывание ^3H -тестостерона цитозолем и ядрами гипофиза взрослых самцов крыс значительно превышает таковое у неполовозрелых животных. К моменту пубертации (37—42-й дни жизни) количество мест связывания 5α -андростан- 3β , 17β -диола в гипофизе достигает максимального уровня (Thieulant et al., 1982). В соответствии с современными представлениями о ведущей роли гипоталамуса в регуляции полового развития находятся наблюдения относительно резкого увеличения концентрации рецепторов 5α -дигидротестостерона в гипоталамусе самцов крыс 2—3-недельного возраста (Kato, 1976).

Способность гипоталамуса накапливать значительные количества ^3H -тестостерона установлена только у половозрелых самок крыс, в отличие от животных трехдневного и десятидневного возраста (Lobl, Scharigo, 1972). В опытах на неонатально андрогенизированных самках и неонатально кастрированных самцах крыс И. В. Шишкина с соавт. (1983) продемонстрировали исчезновение половых различий связывания тестостерона цитоплазматической и ядерной фракциями отдельных областей гипоталамуса. Эти и другие данные подтверждают концепцию о важнейшей роли рецепторов андрогенов в процессах индивидуального развития. Следует, однако, иметь в виду, что, поскольку синтез андрогенных рецепторов генетически сцеплен с X-хромосомой, а ткани эмбрионов мужского и женского полов имеют одинаково развитую систему рецепторов и в равной степени способны реагировать на андрогенные воздействия, половые различия в содержании андрогенных рецепторов у взрослых особей определяются природой гормонов, секретлируемых гонадами.

Старение организма сопровождается угасанием функциональной активности мужских половых желез. Вероятно, именно поэтому у стареющих животных уменьшается концентрация рецепторов андрогенов в предстательной железе (Shain et al., 1975).

Общее число рецепторных мест для андрогенов в каждой клетке на протяжении жизни почти не изменяется (Fichman et al., 1981). Однако распределение их между цитоплазмой и ядром изменяется значительно, причем величина ядерного связывания повышается параллельно с увеличением концентрации циркулирующих андрогенов в определенные периоды индивидуального развития. Следовательно, процентное содержание ядерных рецепторов отражает уровень андрогенной активности.

Таким образом, возрастная динамика изменений уровня связывания андрогенов тканями центральной нервной системы и органов половой сферы позволяет допустить участие циторекцепторов в передаче и модуляции регулирующего влияния андрогенов в онтогенезе.

Пожалуй, наиболее впечатляющей иллюстрацией участия андрогенных циторекцепторов в формировании вторичных мужских

половых признаков служат экспериментальные и клинические данные о патогенезе синдрома тестикулярной феминизации (Bardin, Catterall, 1981; Wilson et al., 1981; Chung et al., 1983). Удобными объектами для исследования рецепции андрогенов при данной патологии являются мутантные линии мышей Tfm и оклахомских крыс. Этот полиморфный синдром характеризуется мужским генотипом, наличием семенников, продуцирующих, как правило, нормальное количество тестостерона, и женским фенотипом. Полная или частичная резистентность тканей к андрогенам является причиной недоразвития производных вольфова протока, уrogenитального синуса и наружных гениталий. Степень феминизации зависит от глубины поражения андроген-рецепторной системы.

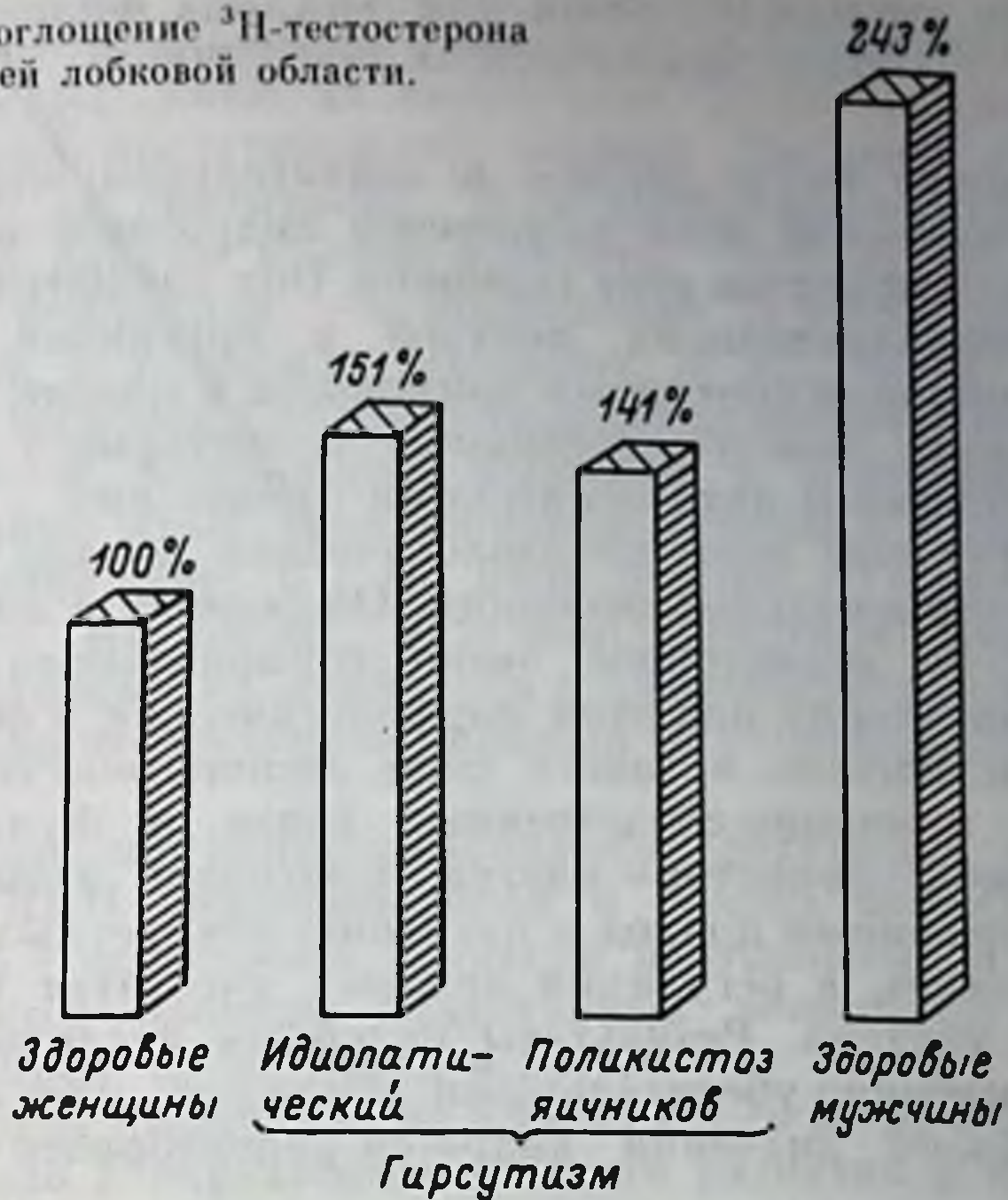
При тяжелых формах тестикулярной феминизации содержание андрогенных рецепторов в тканях находится на неопределяемом уровне или не превышает 10 % связывания гормонов у нормальных самцов мышей и крыс. Резкое снижение концентрации андрогенных рецепторов обнаружено в культивируемых фибробластах кожи людей с тестикулярной феминизацией (Berkovitz et al., 1983). Менее тяжелые формы, обозначаемые как синдром Рейнфенштейна, характеризуются примерно двукратным уменьшением рецепторной активности фибробластов. При клиническом обследовании больных мужчины обнаруживают аномалии развития в виде увеличения грудных желез, отсутствия сперматогенеза, гипоспадии, недоразвития полового члена, а в более тяжелых случаях — наличия короткого слепого влагалища.

При синдроме тестикулярной феминизации дефицит рецепторов андрогенов в аденогипофизе и центральной нервной системе коррелирует с ослаблением тормозного влияния тестостерона на гонадотропную активность гипофиза (Naess et al., 1976). Логично заключить, что в норме андрогенные рецепторы «замыкают» цепь регуляции функции гонад по типу обратной связи.

Дефектность рецепторной системы может проявляться не только в уменьшении числа андрогенсвязывающих локусов клеток-мишеней, но и в определенных качественных изменениях. Под качественными изменениями подразумевают неспособность аномальных рецепторов перемещаться в ядро клетки или взаимодействовать с компонентами хроматина. Разумеется, в этих случаях предварительно исключают нарушение 5 α -редуктазной активности как возможную причину нечувствительности к тестостерону. Описана полная нечувствительность к андрогенам у людей с нормальной дигидротестостеронсвязывающей способностью фибробластов кожи генитальной области (Brown et al., 1982). В скелетных мышцах мышей линии Tfm имеются цитозольные рецепторы андрогенов (при отсутствии их в других тканях-мишенях), но они качественно изменены и не связываются с ДНК, т. е. не способны акцептироваться ядерным материалом.

Известно, что андрогены необходимы для поддержания сперматогенеза. Наличие соответствующих рецепторных белков в ядрах

Рис. 2. Поглощение ^3H -тестостерона кожей лобковой области.



герминативных клеток семенников указывает на вероятное участие их в гормональной регуляции сперматогенеза (Wright, Frankel, 1980).

Клинические проявления андрогенной гиперфункции нередко коррелируют с изменением содержания циторецепторов. В цитоплазматической фракции клеток кожи женщин с оволосением по мужскому типу (гирсутизм) концентрация рецепторов андрогенов уменьшена (Mowzowich et al., 1981), хотя их суммарное содержание в цитоплазме и ядрах сохраняется нормальным (Mowzowich et al., 1983). Последнее указывает на увеличение транслокации в ядро и относительное преобладание ядерной фракции рецепторов.

Изучая поглощение ^3H -тестостерона *in vitro* биоптатами кожи, взятой из области лобка у здоровых мужчин и женщин, а также у больных гирсутизмом, мы обнаружили заметные различия между сравниваемыми группами (рис. 2). После инкубации в течение 1 ч радиоактивность кожи мужчин (в расчете на 1 мг ткани) в 2—2.5 раза превышала таковую у здоровых женщин. Для гирсутного синдрома характерно усиленное поглощение меченого тестостерона — в среднем на 50%. Повышенная аккумуляция андрогена зарегистрирована и при идиопатическом гирсутизме, при котором содержание тестостерона в циркулирующей крови находится в нормальных пределах. По-видимому, увеличение рецепции андрогенов обуславливает повышенную чувствительность волосяных фолликулов к стимулирующему влиянию этих гормонов на рост волос.

ПРИМЕНЕНИЕ АНТИАНДРОГЕНОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РОЛИ АНДРОГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Приведенные выше данные в значительной мере укрепили гипотезу о ключевой роли рецепторов андрогенов в реализации биологических эффектов этих гормонов. Они касаются распределения андрогенсвязывающих локусов в организме, свойств и поведения гормон-рецепторных комплексов в клетке, коррелятивных отношений между состоянием рецепторного аппарата и физиологическими и патологическими процессами.

Существует еще один методологический подход к изучению физиологии гормональной рецепции. Он состоит в избирательном воздействии на рецепторное звено гормонального эффекта и анализе возникающих при этом морфологических и функциональных сдвигов. Именно в такого рода экспериментах становятся очевидными причинно-следственные связи в функциональной системе гормон—рецептор—клетка. Благодаря этому возможен дифференцированный подход к изучению конкретных физиологических процессов, в регуляции которых участвует та или иная рецепторная система. Результаты подобных исследований представляются особенно убедительными, когда речь идет о выяснении физиологического значения андроген-рецепторного взаимодействия.

В последние годы благодаря открытию антиандрогенных веществ появилась возможность избирательно исключать рецепторы андрогенов из сферы физиологического действия этих гормонов (Neumann, Steinbeck, 1974; Резников, Варга, 1979, 1982). Антиандрогенами называют конкурентные антагонисты мужских половых гормонов, которые способны занимать места специфического связывания андрогенов на молекулах рецепторов, препятствуя реализации гормональных эффектов.

Большинство известных антиандрогенов (ципротерон-ацетат, хлормадион-ацетат и др.) имеет стероидную структуру. Это обуславливает наличие у них гестагенной, кортикостероидной, антигонадотропной и других видов биологической активности и делает малопригодным инструментом для исследования андрогензависимых процессов.

Перспективными в этом отношении являются нестероидные антиандрогены, прежде всего карбоксианилид флутамид (Negi et al., 1972) и его отечественный аналог — нифтолид, синтезированный в Киевском научно-исследовательском институте эндокринологии и обмена веществ Минздрава УССР и Институте органической химии АН УССР (Резников и др., 1977а, 1977б). Они относятся к группе так называемых чистых антиандрогенов, т. е. конкурентных блокаторов андрогенных рецепторов без видимых побочных эффектов. Высокой антиандрогенной активностью обладают также RU-23908 (Raupauld et al., 1979) и другие карбоксианилиды (Negi et al., 1979; Варга и др., 1983).

В опытах на крысах с применением меченных тритием

андрогенов высокой удельной радиоактивности показано угнетающее влияние RU-23908 на связывание ^3H -тестостерона рецепторами цитозола предстательной железы (Raynaud et al., 1979), флутамида — на связывание ^3H - 5α -дигидротестостерона и удержание его ядрами клеток простаты (Liao et al., 1974; Peets et al., 1974), нифтолида — на поглощение ^3H -тестостерона тканями гипоталамуса и гипофиза (Reznikov et al., 1978). По данным С. В. Варги, нифтолид резко уменьшает радиоактивность цитозола и ядер клеток вентральной простаты и семенных пузырьков кастрированных крыс, обнаруживаемую через 1 ч после введения ^3H -тестостерона (рис. 3). По ряду данных (Tezon et al., 1982) на примере RU-23908, механизм действия антиандрогенов состоит в образовании комплекса с цитоплазматическим рецептором 5α -дигидротестостерона, который не способен к транслокации в ядро.

В лаборатории нейрогормональной регуляции размножения Киевского НИИ эндокринологии и обмена веществ с 1974 г. проводилось всестороннее изучение центральных и периферических эффектов блокады андрогенных рецепторов нифтолидом (А. Г. Резников, С. В. Варга и др.).

Применение нифтолида на крысах с 1-го по 20-й день беременности привело к нарушению полового развития у плодов-самцов (рис. 4). При обследовании области наружных гениталий и промежности у них найдены четкие признаки псевдогермафродитизма — уменьшение размеров полового члена, укорочение ано-генитального расстояния, в ряде случаев — незаращение шва мошонки, имитирующее влагалище. Сходные данные были получены другими авторами (Wilson, 1983). Они однозначно свидетельствуют об участии рецепторов андрогенов в контролируемых этими гормонами процессах дифференциации органов репродуктивного тракта у самцов.

В опытах на инфантильных и половозрелых крысах применение нифтолида дало возможность продемонстрировать ключевую роль циторекцепторов в реализации стимулирующего влияния андрогенов на структуру и функцию андрогензависимых органов, на пластический и функциональный обмен веществ в предстательной железе, семенных пузырьках, бульбокавернозной мышце, сердце, печени. Как у интактных, так и у кастрированных животных, получающих тестостерон-пропионат (ТП), нифтолид вызывает резкую атрофию добавочных половых желез, сравнимую с эффектом кастрации (рис. 5), подавляет выработку простатического сока и секрета семенных пузырьков, уменьшает синтез белка и нуклеиновых кислот. Атрофический эффект нифтолида в вентральной простате документирован гистологическими и морфометрическими исследованиями. При пероральном применении в течение недели по 25 мг/кг массы тела нифтолид (масляный раствор) полностью подавляет реакцию секреторного эпителия на ТП (150 мкг/кг) у кастрированных неполовозрелых крыс, а также на эндогенные гормоны — у взрослых собак и крыс (рис. 6, 7). В первом случае высота эпителия уменьшалась с 22.4 ± 0.36 до

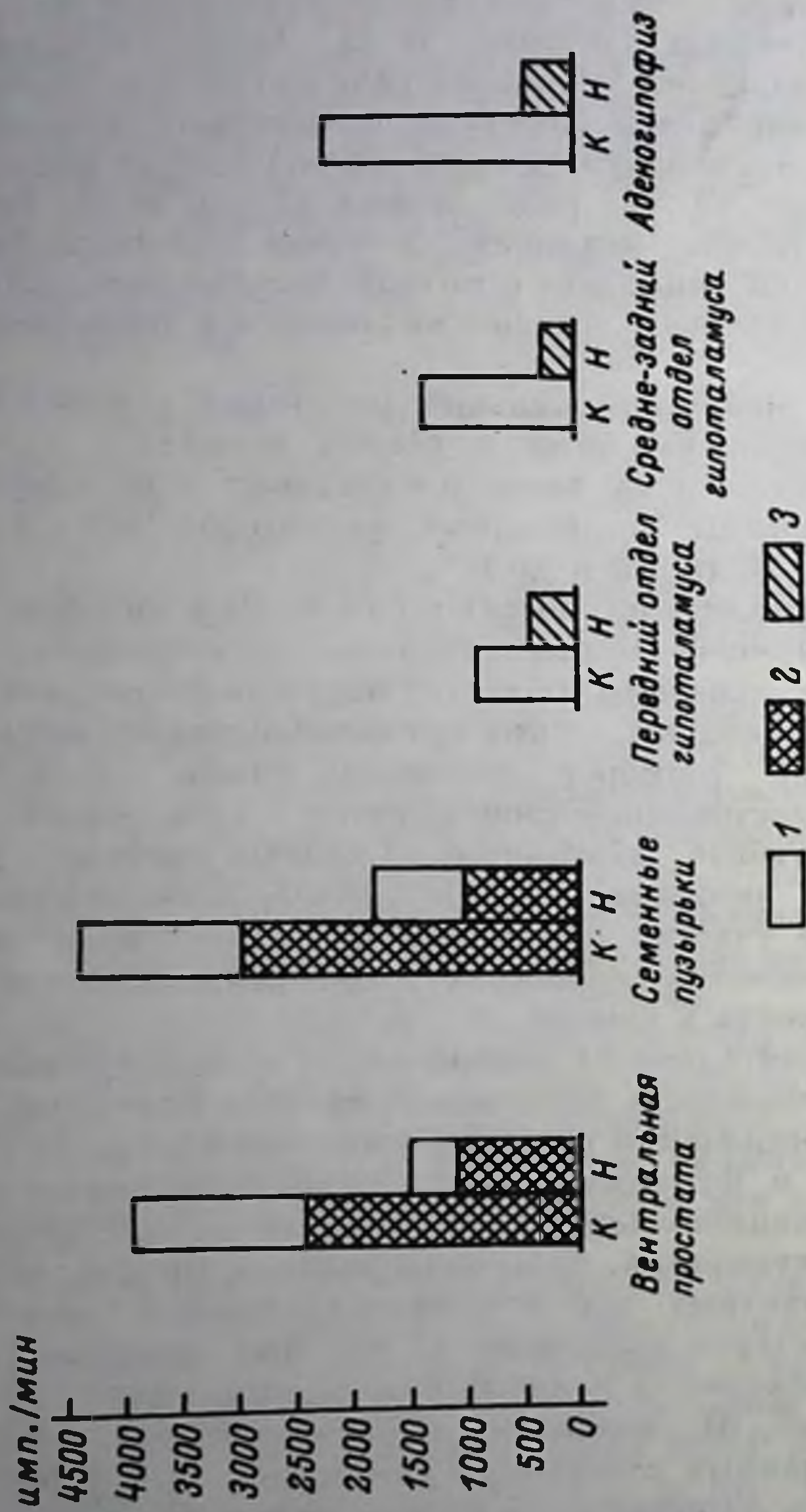


Рис. 3. Влияние нифтолида на радиоактивность цитозола (имп./мин/мг белка), ядер (имп./мин/мг ДНК) и гомогената (имп./мин/мг ткани) органов-мишеней у кастрированных крыс через 1 ч после внутрибрюшинного введения ^3H -тестостерона (250 мкКи/кг массы тела, уд. акт. 48 Ки/ммоль).

Нифтолид вводили подкожно в дозе 25 мг/кг за 1 ч до инъекции ^3H -тестостерона. К — контроль, Н — нифтолид. 1 — цитозол, 2 — ядра, 3 — гомогенат.

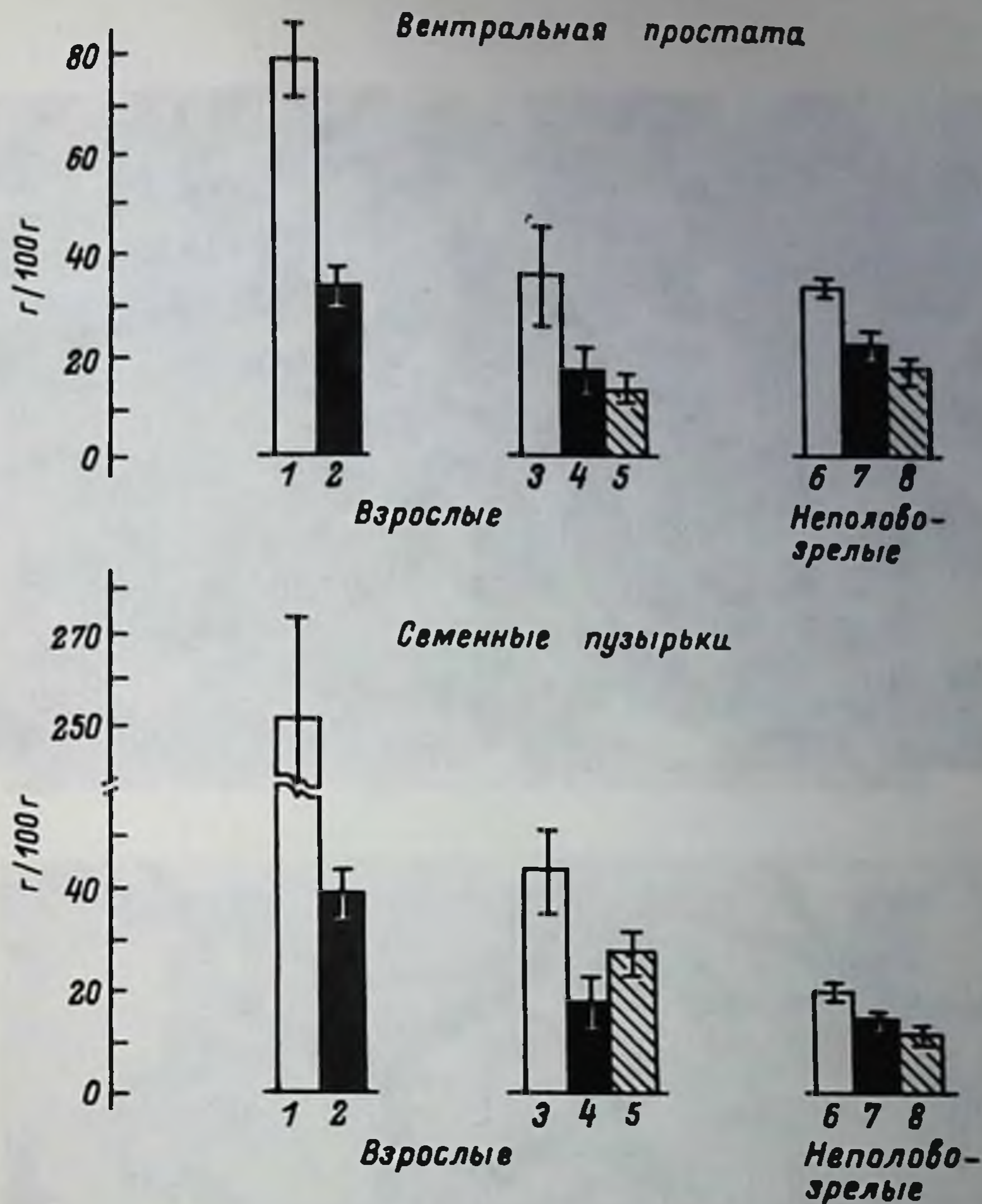


Рис. 4. Изменение массы добавочных половых желез у взрослых и неполовозрелых самцов крыс (г/100 г массы тела) в условиях блокады андрогенных рецепторов нифтолидом.

1 — контроль (масло); 2 — нифтолид (25 мг/кг × 10 дн.); 3 — кастрация + ТП (250 мкг/кг × 8 дн.); 4 — то же + нифтолид (25 мг/кг × 8 дн.); 5 — кастрация + масло (8 дн.); 6 — кастрация + ТП (150 мкг/кг × 7 дн.); 7 — то же + нифтолид (25 мг/кг × 7 дн.); 8 — кастрация + масло (7 дн.).

13.3 ± 0.37 мкм, что не отличается от аналогичного показателя у кастрированных крыс (13.2 ± 0.11 мкм). Атрофические изменения простаты и семенных пузырьков обнаружены также у морских свинок при парентеральном введении нифтолида.

Большой фрагмент этих исследований касается изучения синтеза белка и нуклеиновых кислот в андрогензависимых органах самцов крыс в условиях блокады рецепции андрогенов нифтолидом (Варга, Синицын, 1979, 1982). Половозрелым крысам вводили

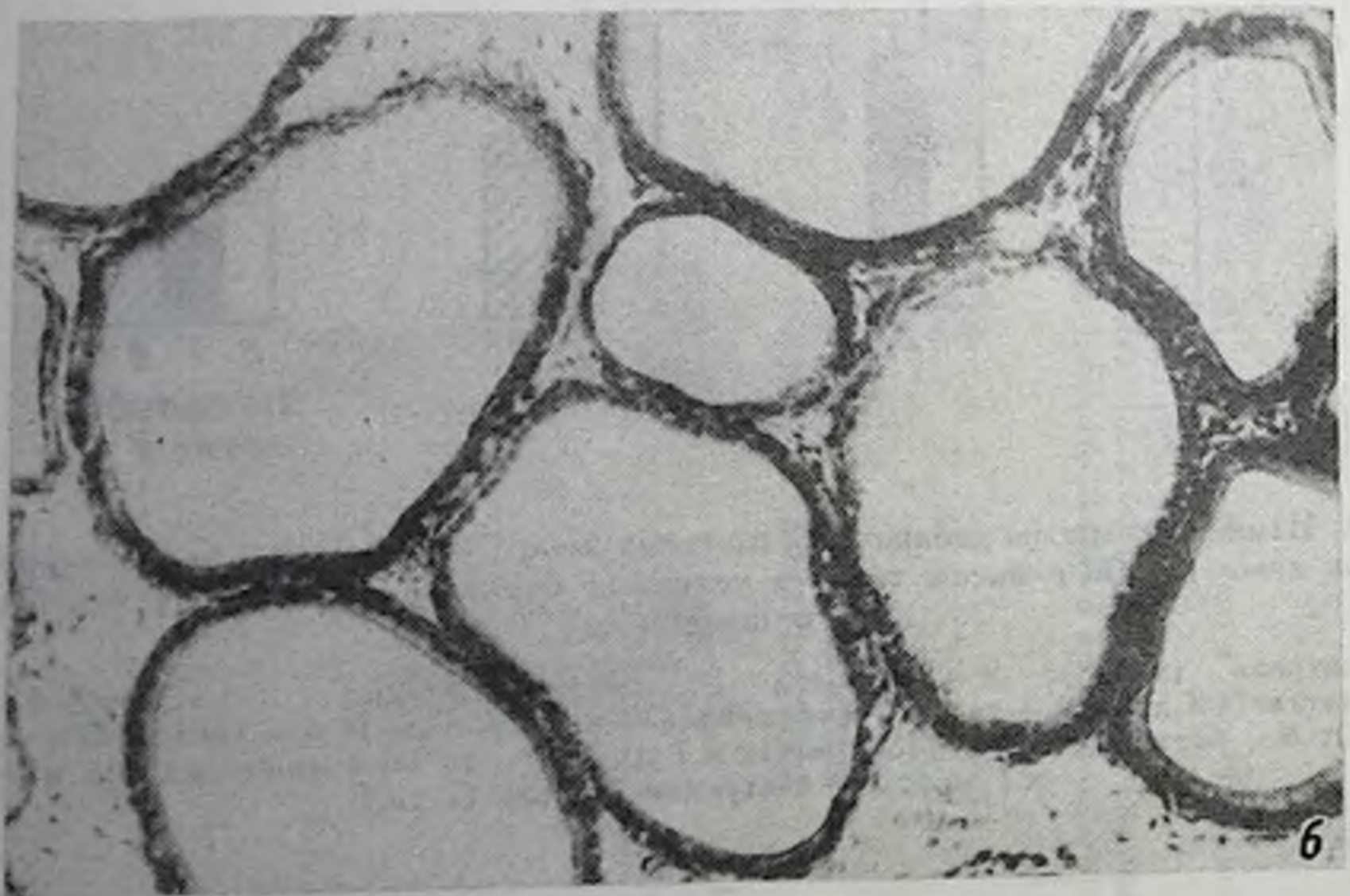
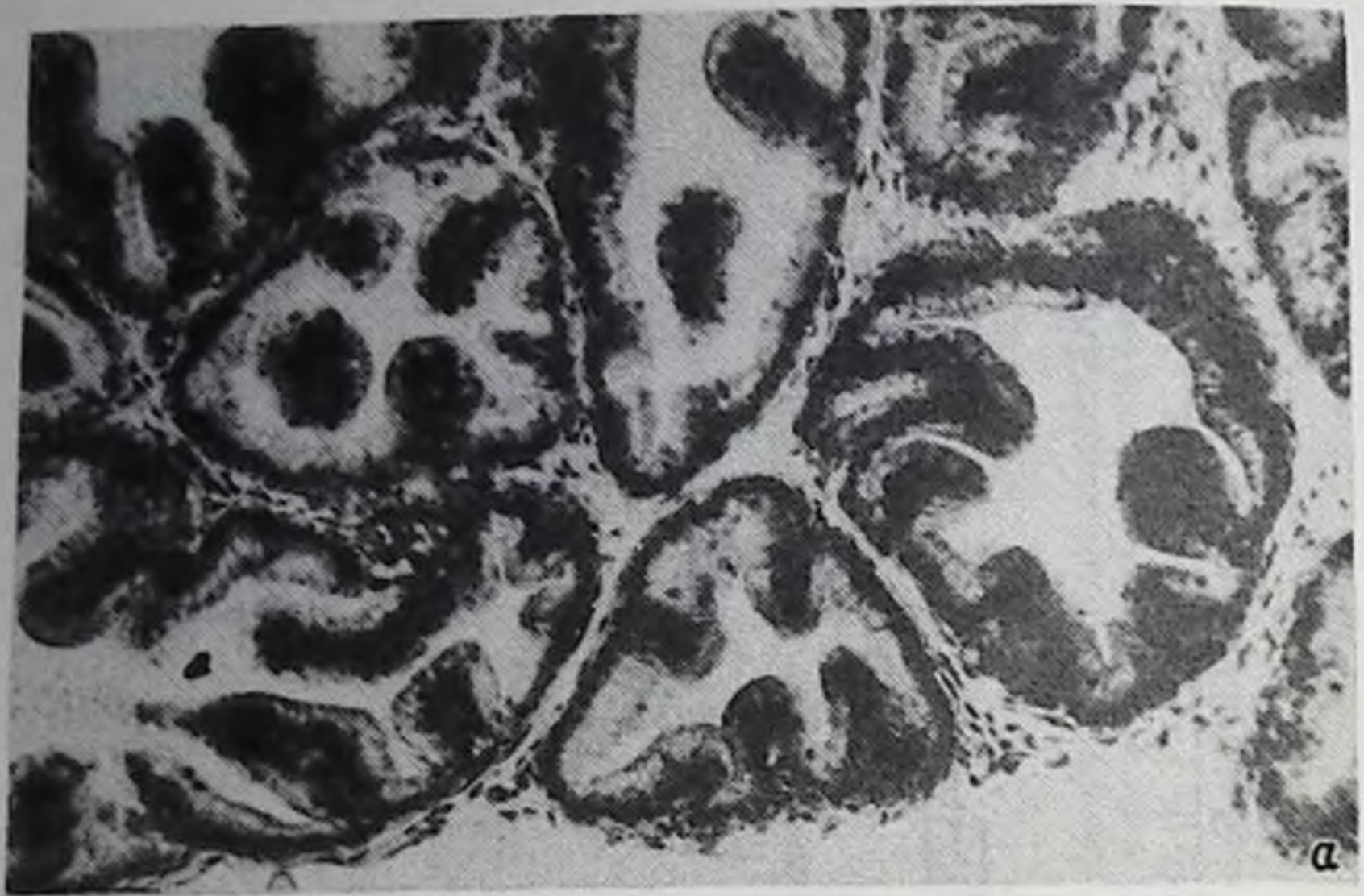


Рис. 5. Атрофия эпителия предстательной железы у крыс, вызванная нифтолидом.
a — контроль (масло), *б* — нифтолид (10 мг/кг × 8 дн.), *в* — кастрация + ТП (150 мкг ×
× 7 дн.), *г* — то же + нифтолид (25 мг/кг × 7 дн.). Гематоксилин-эозин. Ув. 90×.

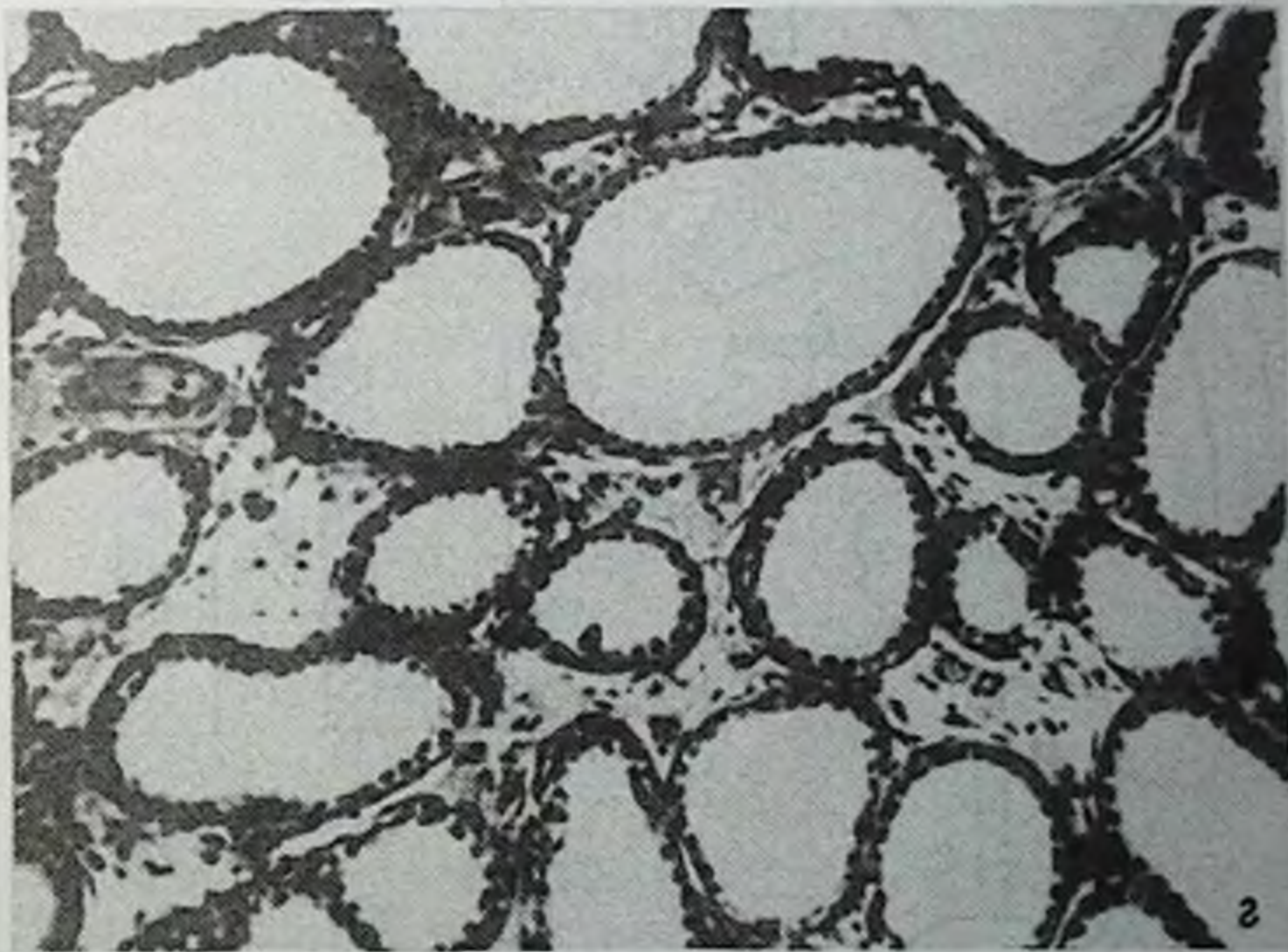
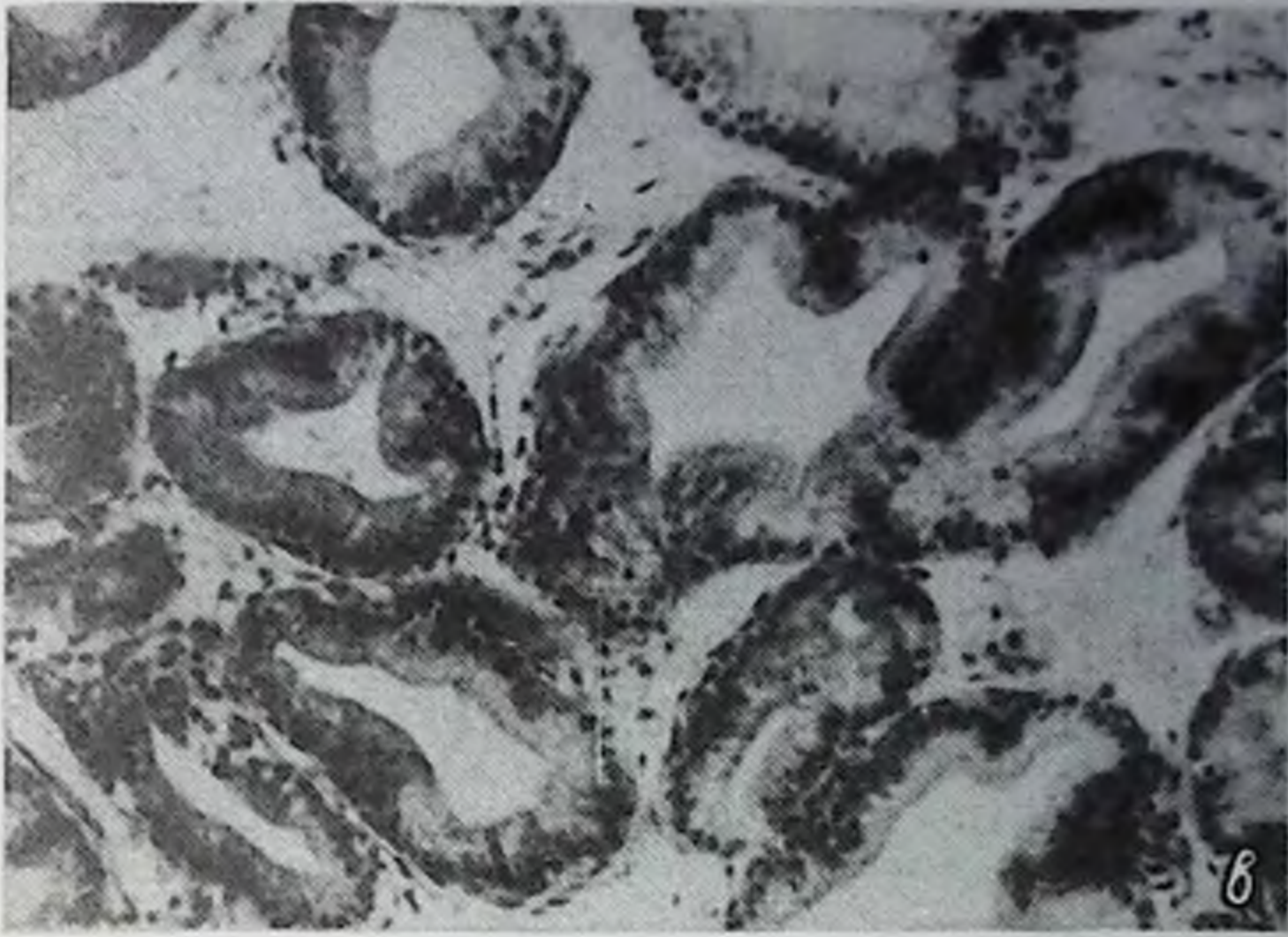


Рис. 5 (продолжение).

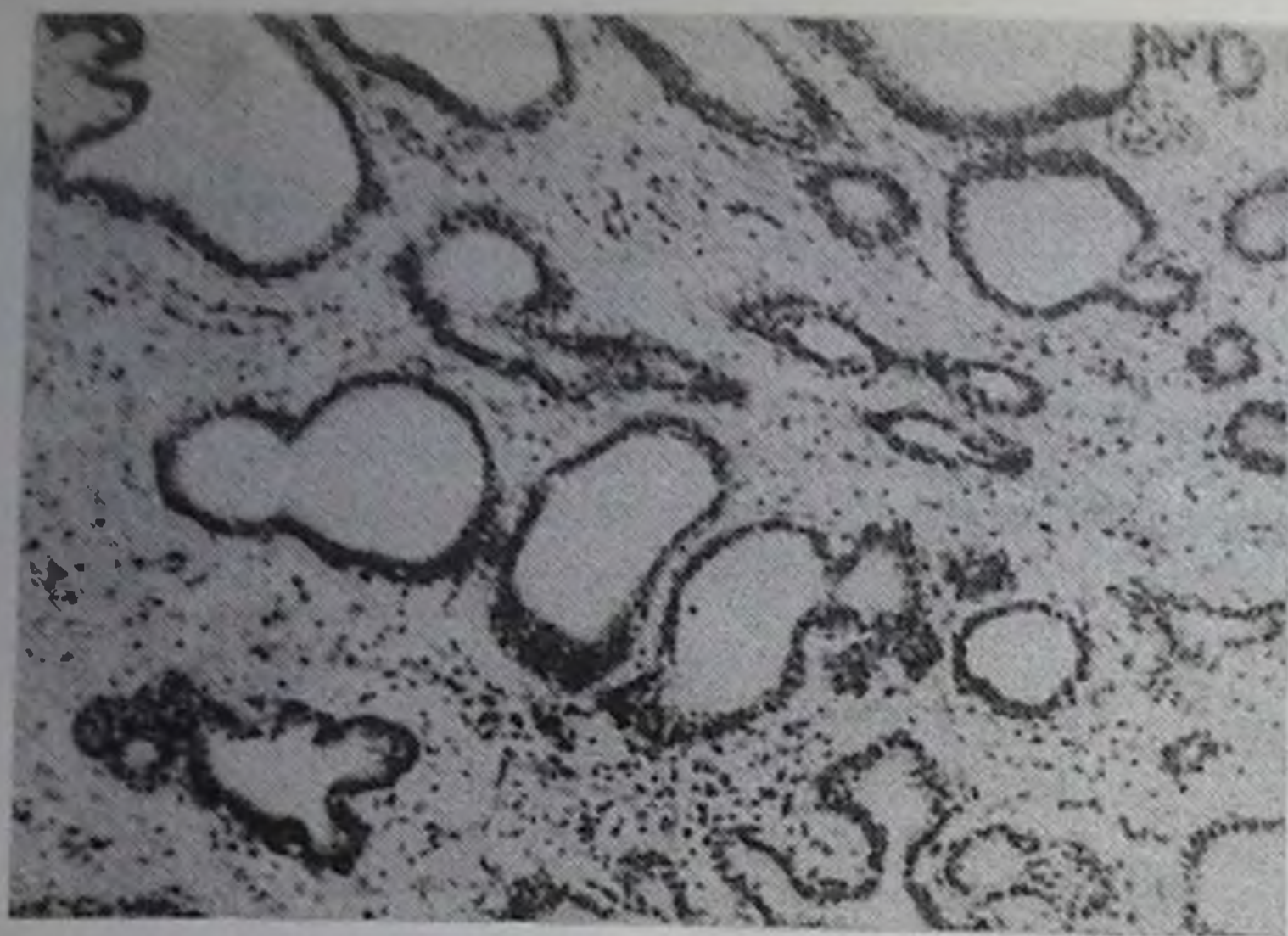


Рис. 6. Атрофия эпителия предстательной железы у собаки, вызванная нифтолидом (10 мг/кг × 3 мес). Гематоксиллин-эозин. Ув. 90×.

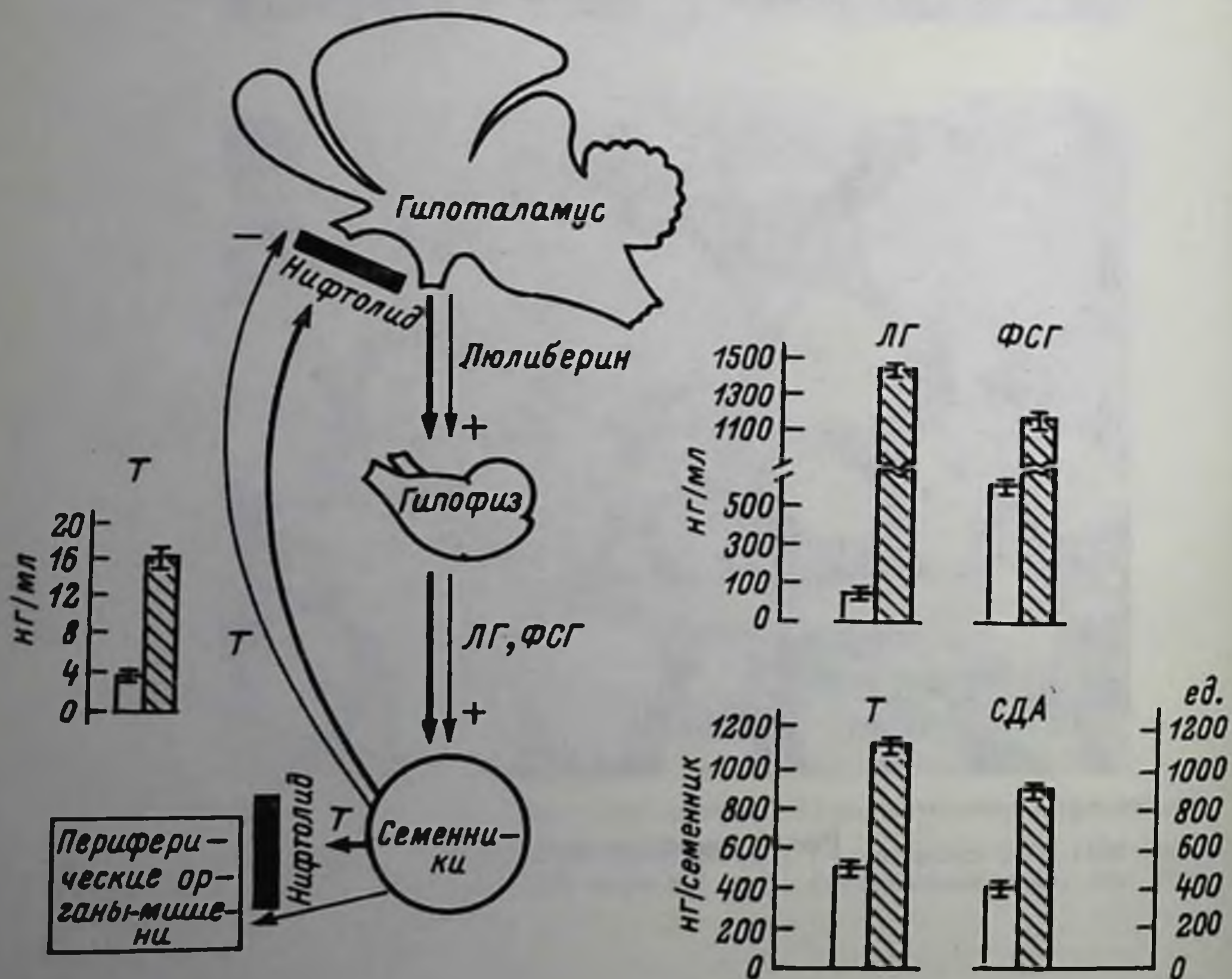


Рис. 7. Механизм активирующего влияния блокатора андрогенных рецепторов — нифтолида на систему гипоталамус—гипофиз—семенники у крыс.

ЛГ, ФСГ — лютеинизирующий, фолликулостимулирующий гормоны, Т — тестостерон, СДА — Δ^5 -3 β -оА-стероиддегидрогеназная активность в семеннике.

раствор нифтолида в косточковом масле (25 мг/кг) в течение 8 дней или растворитель андиандрогена (контроль); кастрированным (с первого дня после операции) — ТП внутримышечно по 0.25 мг/кг или ТП в сочетании с нифтолидом (25 мг/кг) в течение 8 дней. За 2 ч до убоя внутрибрюшинно инъецировали смесь ^3H -уридина, ^3H -5-метилтимидина и ^3H -DL-лейцина (кастрированным — ^{14}C -DL-лейцина).

Интенсивность биосинтеза макромолекул под влиянием нифтолида снижалась в 1.5—2.5 раза (см. таблицу). В отсутствие эндодили экзогенных андрогенов этот эффект не проявлялся. Следовательно, фармакологическая блокада рецепторов устраняет стимулирующее влияние андрогенов на процессы транскрипции и трансляции белкового синтеза в органах-мишенях, что лежит в основе биологических эффектов мужских половых гормонов. Подавление синтеза биополимеров обуславливает атрофию андрогензависимых органов.

Включение меченых предшественников в нуклеиновые кислоты и белок (распады/мин/мг свежей ткани через 2 ч после введения метки) органов-мишеней в условиях блокады андрогенных рецепторов нифтолидом (рег оз 25 мг/кг×8 дн.)

Исследуемый биополимер	Интактные крысы		Кастрированные крысы	
	контроль (масло)	нифтолид	ТП	ТП+нифтолид
Вентральная простата				
ДНК	91±3.0	77±4.6	150±21.3	74±6.7
<i>p</i>	<0.05		<0.01	
РНК	78±5.0	73±4.6	194±25.3	98±8.0
<i>p</i>	>0.05		<0.01	
Белок	260±19.0	256±25.0	187±25.3	91±10.3
<i>p</i>	>0.05		<0.01	
Семенные пузырьки				
ДНК	371±18.0	125±10.0	254±50.0	106±9.7
<i>p</i>	<0.001		<0.02	
РНК	225±24.0	240±42.0	363±47.7	187±18.7
<i>p</i>	>0.05		<0.01	
Белок	900±62.0	530±40.0	213±35.0	140±11.0
<i>p</i>	<0.001		<0.05	
Мышца levator ani				
ДНК	10±1.6	4.6±0.5	—	—
<i>p</i>	<0.05			
РНК	22±2.2	23±2.0	—	—
<i>p</i>	>0.05			
Белок	67±14	29±3.2	—	—
<i>p</i>	<0.05			

Интересно отметить, что у интактных крыс нифтолид вызывал менее выраженные изменения синтеза нуклеиновых кислот и белка, чем у кастрированных, получавших ТП. Вероятнее всего, это связано с вызываемым нифтолидом повышением уровня тестостерона в крови, о чем сказано ниже. Повышение уровня эндогенных андрогенов может частично преодолевать блокаду

андрогенных рецепторов, обусловленную присутствием нифтолида в организме.

К числу известных эффектов тестостерона в предстательной железе и семенных пузырьках относится индукция активности ключевых ферментов гликолиза — гексокиназы и фосфофруктокиназы. С помощью нифтолида удалось показать, что эти реакции опосредуются рецепторами андрогенов (Строев, Лихванцев, 1982).

Из наблюдений, свидетельствующих о вызываемой нифтолидом атрофии *m. levator ani* и ее связи с нарушением биосинтетических процессов (см. таблицу), с очевидностью следует, что рецепция андрогенов является существенным компонентом не только специфического андрогенного ответа, но и анаболического действия мужских половых гормонов. Результаты этих наблюдений находятся в соответствии с данными М. Г. Степанова (1984) о присутствии в скелетных мышцах специфических рецепторных белков, связывающих андрогены анаболического ряда.

Нестероидные антиандрогены оказались весьма удобным «инструментом» для изучения гормональной регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы, поведения животных, нейроэндокринной регуляции репродукции и других физиологических функций.

Так, по нашим данным, в условиях блокады андрогенных рецепторов нифтолидом (10 мг/кг в течение 3 мес) у собак изменяется биоэлектрическая активность сердца и возникают гистохимические признаки атрофических изменений миокарда (Божок и др., 1979; Воробьева, Варга, 1981). Изменение основных показателей электрокардиограммы (тахикардия, уширение и зазубренность комплекса QRS, инверсия положительных зубцов T или углубление отрицательных, увеличение систолического показателя) совпадают с таковыми у орхидэктомированных собак. Вероятно, они связаны с ослаблением андрогенных влияний на метаболизм миокарда. Это предположение подтверждается сведениями о вызываемом нифтолидом угнетении синтеза белка и уменьшении содержания РНК в миокарде крыс (Дзюбак, 1981).

Важно подчеркнуть, что нарушения метаболизма и биоэлектрической активности сердца в условиях блокады рецепторов весьма напоминают посткастрационные изменения, хотя содержание тестостерона в циркулирующей крови не только не снижено, но, напротив, значительно повышено. Таким образом, можно утверждать, что рецепторам андрогенов принадлежит важнейшая роль в регуляторных влияниях этих гормонов на сердце. Этот вывод полностью согласуется с данными о наличии в миокарде андроген-рецепторных белков и гипотезой, рассматривающей сердце как орган-мишень андрогенных гормонов (Smith et al., 1979; McGill, 1980).

Не будет преувеличением сказать, что использование антиандрогенов открыло новую главу в изучении механизмов действия мужских половых гормонов на центральную нервную систему. В частности, опыты с применением «чистого» антиандрогена

ципротерона прояснили вопрос об участии рецепторов андрогенов в половой дифференциации мозга. Ципротероновая блокада рецепторов у новорожденных самцов крыс предотвращает маскулинизирующее влияние тестикулярных андрогенов на гипоталамический контроль секреции гонадотропинов (Tuohimaa, Niemi, 1972). Однако наши неоднократные попытки заблокировать аналогичное влияние тестостерона-пропионата на нейроэндокринную систему новорожденных самок крыс одновременным введением нифтолида оказались тщетными: антиандроген не предотвращал поликистоз яичников и персистентный эструс. По-видимому, вопрос, о необходимости взаимодействия андрогенов с рецепторами в механизме неонатального программирования секреции гонадотропинов нуждается в уточнении. В то же время флутамид тормозит индукцию тестостероном мужских копулятивных реакций, что говорит о важном значении рецепторного звена в андрогензависимой мотивации полового поведения (Gladue, Clemens, 1980).

Значительный интерес вызывает применение антиандрогенов для изучения центральной регуляции половых желез. Исходной предпосылкой для этих исследований служит сходство, а возможно идентичность, физико-химических свойств андрогенных рецепторов гипоталамуса, гипофиза и периферических органов мужской репродуктивной системы — предстательной железы, семенных пузырьков, семенников и их придатков (Kato, 1975; Naess et al., 1975; Naess, 1976). Отсюда следует, что при введении в организм антиандрогенного вещества блокада рецепции будет распространяться не только на органы половой системы, но и на причастные к ее регуляции нейроэндокринные центры.

Действительно, нифтолид резко уменьшает захват ^3H -тестостерона тканями гипоталамуса и гипофиза кастрированных самцов крыс — см. рис. 3 (Резников и др., 1978б). Антагонистические свойства этого вещества по отношению к взаимодействию андрогенов с циторецепторами в гипоталамусе и гипофизе были подтверждены Яманакой с соавт. (Yamanaka et al., 1979). Авторы наблюдали угнетение флутамидом *in vitro* связывания 5α -дигидротестостерона с макромолекулами цитозола (фракция 7—8S) указанных органов соответственно на 32 и 41 %.

Благодаря применению нифтолида удалось получить достаточно надежные доказательства непосредственного участия андрогенных рецепторов гипоталамуса в функционировании механизма обратной связи между гонадами и гипоталамо-гипофизарной системой, контролирующего уровень тестикулярных гормонов в циркулирующей крови у человека и животных (Резников и др., 1977б, 1977в, 1978а, 1978б; Резников, Дзвонкевич, 1978; Резников, Волкова, 1979). В результате снятия нифтолидом тормозного влияния эндогенных андрогенов на секрецию гонадотропинов происходит разрыв контура обратной связи в системе гипоталамус-гипофиз-семенники. Это влечет за собой увеличение секреции лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормо-

нов, тестостерона, биосинтеза и содержания андрогенов в половых железах, а также ряд морфологических изменений в гипофизе и гонадах, свидетельствующих о возрастании их функциональной активности.

Поскольку контур отрицательной обратной связи в репродуктивной системе замыкается на уровне гипоталамуса, нет ничего удивительного в том, что электролитическая деструкция аркуатного ядра и срединного возвышения гипоталамуса устраняет или значительно ослабляет стимулирующее влияние нифтолида на секрецию гонадотропных гормонов (Резников, Волкова, 1979). Остаточная реакция может быть в какой-то мере объяснена сохранением коллатеральных сосудистых связей аденогипофиза с сосудистым органом концевой пластинки и другими гонадолиберинпродуцирующими структурами мозга. Но наиболее вероятной причиной ее является блокада андрогенных рецепторов гипофиза, которые, как было показано (Kamel, Grey, 1980) в опытах с использованием ципротерона на культуре гипофиза крыс, также опосредуют торможение секреции лютеинизирующего гормона, вызванное тестостероном.

На основе экспериментальных исследований представилось возможным разработать принципиально новый функциональный тест для оценки гонадотропных резервов гипоталамо-гипофизарной системы у человека (Резников и др., 1978; Резников, 1980), что имеет важное значение для дифференциальной диагностики первичного и вторичного гипогонадизма у мужчин и подростков. Кстати, при этом выяснилось интересное обстоятельство: у здоровых людей амплитуда гормональных сдвигов, возникающих в ответ на блокаду андрогенных рецепторов, намного меньше, чем у крыс и других животных. Очевидно, система гонадостата у людей функционирует на более высоком пороговом уровне действия тестостерона.

Результаты проведенных исследований и выводы из них нашли подтверждение в работах (Kalra, Kalra, 1980; Grey et al., 1982), описавших угнетающее действие антиандрогена флутамида на торможение тестостероном и дигидротестостероном посткастрационного роста секреции лютеинизирующего гормона и уменьшения содержания ЛГ-релизинг-гормона в медиобазальной области гипоталамуса самцов крыс. Аналогичным образом следует интерпретировать данные о подъеме уровня лютеинизирующего гормона в крови самцов крыс после имплантации в аркуатное ядро гипоталамуса другого нестероидного антиандрогена — АА 560 (Yamanaka, 1981).

Представленный в настоящей главе фактический материал далеко не исчерпывает всех физиологических аспектов рецепции андрогенов. Вместе с тем он не оставляет сомнений в том, что циторецепторы андрогенов непосредственно вовлечены в инициацию многочисленных физиологических процессов, регулируемых мужскими половыми гормонами.

Л и т е р а т у р а

- Божок Ю. М., Варга С. В., Воробьева Т. М., Резников А. Г. Структурные и функциональные изменения сердца у собак в условиях фармакологической блокады периферического действия андрогенов. — В кн.: Нервные и гуморальные механизмы возникновения основных заболеваний сердечно-сосудистой системы. Полтава, 1979, с. 16.
- Варга С. В., Резников А. Г., Бальян Я. Г. и др. Антиандрогенная активность некоторых замещенных карбоксианилидов. — Пробл. эндокринолог., 1983, т. 29, № 2, с. 67—71.
- Варга С. В., Сииницын П. В. Биосинтез нуклеиновых кислот и белка в аксессуарных половых органах крыс при блокаде действия тестостерона антиандрогеном 4-нитро-3-трифторметилизобутиранилидом. — Пробл. эндокринолог., 1979, т. 24, № 4, с. 107—111.
- Варга С. В., Сииницын П. В. Биосинтез нуклеиновых кислот и белка в андрогенчувствительных органах интактных самцов крыс в условиях введения нестероидного антиандрогена нифтолида. — Пробл. эндокринолог., 1982, т. 28, № 4, с. 73—77.
- Воробьева Т. М., Варга С. В. Биоэлектрическая активность сердца у собак в условиях блокады действия андрогенов нифтолидом. — В кн.: Эндокринология. Киев: Здоровье, 1981, вып. 11, с. 114—117.
- Дзюбак А. Д. Влияние нифтолида на интенсивность синтеза белка и содержание РНК в сердце интактных крыс и в условиях изадриновых повреждений миокарда. — В кн.: Эндокринология. Киев: Здоровье, 1981, вып. 11, с. 97—101.
- Мейнуоринг У. Механизм действия андрогенов: Пер. с англ. М.: Мир, 1979. 224 с.
- Резников А. Г. Экспериментальная разработка нового метода тестирования гонадотропных резервов гипоталамо-гипофизарной системы. — В кн.: Эндокринология мужского бесплодия. Материалы 1-го республиканского симпозиума. Тбилиси: Мецниереба, 1980, с. 92—105.
- Резников А. Г. Половые гормоны дифференциации мозга. Киев: Наукова думка, 1982. 252 с.
- Резников А. Г., Беникова Е. А., Демченко В. Н. О возможности применения антиандрогена 4-нитро-3-трифторметилизобутиранилида для оценки гонадотропных резервов гипоталамо-гипофизарной системы. — Физиол. журн. АН УССР, 1978а, № 5, с. 687—691.
- Резников А. Г., Варга С. В. Антиандрогены. — Пробл. эндокринолог., 1979, т. 25, № 3, с. 79—86.
- Резников А. Г., Варга С. В. Антиандрогены и перспективы их применения. — В кн.: Эндокринология сегодня. Киев: Наукова думка, 1982, с. 201—213.
- Резников А. Г., Варга С. В., Демкив Л. П. и др. Экспериментальное изучение антиандрогенной активности 4-нитро-3-трифторметилизобутиранилида (нифтолида) у крыс и морских свинок. — Фармакол. и токсикол., 1977а, № 3, с. 336—341.
- Резников А. Г., Волкова Н. Н. Участие гипоталамуса в реакции гипофиза и семенников крыс на введение антиандрогена 4-нитро-3-трифторметилизобутиранилида. — Бюл. экспер. биол. и мед., 1979, № 11, с. 601—603.
- (Резников и др.) Reznikov A. G., Demchenko V. N., Varga S. V., Boshok Yu. M. Hypothalamo-hypophyseal-gonadal system in male rats and guinea pigs treated with the antiandrogen 4-nitro-3-trifluoromethylisobutyranilide. — Endokrinologie, 1978b, Bd 72, H. 3, S. 276—284.
- Резников А. Г., Демченко В. Н., Варга С. В., Носенко Н. Д. Радиоммунологическое и биохимическое исследование реакции аденогипофиза, семенников и надпочечников крыс и морских свинок на введение антиандрогена 4'-нитро-3'-трифторметилизобутиранилида. — Пробл. эндокринолог., 1977б, т. 23, № 2, с. 86—90.
- Резников А. Г., Демченко В. Н., Ягупольский Л. М. и др. Способ определения функционального состояния гипоталамо-гипофизарно-тестикулярной системы. Авт. свидет. СССР № 552962. Заявлено 23.09.1975. Опубликовано 05.04.1977. Бюл. изобрет. и открытий, 1977в, № 13.
- Резников А. Г., Дзвонкевич П. П. Повышение активности стероид- Δ^5 -3 β -ол-

- дегидрогеназы в семенниках крыс при блокаде циторецепторов андрогенов 4-нитро-3-трифторметилизобутиранилидом. — ДАН УССР, сер. Б, 1978, № 1, с. 69—70.
- Розен В. Б., Смирнов А. Н. Рецепторы и стероидные гормоны. М.: Изд-во МГУ, 1981. 310 с.
- Степанов М. Г. Рецепция андрогенов изолированными ядрами скелетных мышц и ее изменения при физической нагрузке и введении 19-нортестостерона: Автореф. дис. . . . канд. биол. наук. Л., 1984.
- Строев Е. А., Лихванцев В. В. Регуляция тестостероном активности гексокиназы и фосфорфруктокиназы в андрогенчувствительных тканях. — Вопр. мед. хим., 1982, № 4, с. 27—30.
- Шишкина И. В., Озоль Л. Ю., Бабичев В. Н. Цитоплазматические и ядерные рецепторы к тестостерону в гипоталамусе у андрогенизированных самок и кастрированных крыс. — Пробл. эндокринолог., 1983, т. 29, № 5, с. 44—48.
- Юдаев Н. А., Асрибекова М. К. Связывание прогестерона и тестостерона в эндометрии человека при беременности. — Пробл. эндокринолог., 1974, т. 20, № 2, с. 24—28.
- Alison M. R., Morley A. R., Wright N. A., Appleton D. R. Androgen uptake and retention in target tissues of varying androgen sensitivity. — J. Endocrinol., 1975, vol. 65, N 3, p. 30—31.
- Attramadal A., Weddington S. C., Nass O. et al. — In: Prostate Diseases. N. Y., 1976. Цит. по: Liao Sh. Molecular Actions of Androgens. — In: Biochemical actions of hormones. N. Y. etc.: Acad. Press, 1977, vol. 4, p. 377.
- Bardin C. W., Catterall J. F. Testosterone: A major determinant of extragenital sexual dimorphism. — Science, 1981, vol. 211, N 4488, p. 1285—1294.
- Baulieu E.-E., Yung I., Blondeau J. P., Robel P. Androgen receptors in rat ventral prostate. — Adv. Biosci., 1971, vol. 7, p. 179—189.
- Berkovitz G. D., Brown T. R., Migeon C. J. Androgen receptors. — Clin. in Endocrinol. and Metabol., 1983, vol. 12, N 1, p. 155—173.
- Brown T. R., Maes M., Rothwell S. W., Migeon C. J. Human complete androgen insensitivity with normal dihydrotestosterone receptor binding capacity in cultured genital skin fibroblasts: Evidence for a qualitative abnormality of the receptor. — J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1982, vol. 55, N 4, p. 61—69.
- Bruchovsky N. Molecular action of androgens and antiandrogens. — In: Androgenization in women. Acne, seborrhoea, androgenic alopecia and hirsutism. (Lectures and discussion of a symposium. Berlin, 23—24 Febr., 1979). Amsterdam etc.: Excerpta Medica, 1980, p. 7—17.
- Chung K. W., Chan W.-Y., Dressler J. B. et al. Androgen receptors in the brain of neonatal normal male and androgen insensitive rats. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1983, vol. 111, N 2, p. 717—722.
- Fichman K. R., Nyberg L. M., Bujnovszky P. et al. The ontogeny of the androgen receptor in human foreskin. — J. Clin. Endocrinol. and Metabol., 1981, vol. 52, p. 919—923.
- Giannopoulos G. Binding of testosterone to uterine components of the immature rat. — J. Biol. Chem., 1973, vol. 248, p. 1004.
- Gladue B. A., Clemens L. G. Flutamide inhibits testosterone-induced masculine sexual behavior in male and female rats. — Endocrinology, 1980, vol. 106, N 6, p. 1917—1922.
- Ichii Sh. 5 α -Dihydrotestosterone binding protein in rat ventral prostate; purification, nuclear incorporation, and subnuclear localization. — Endocrinol. jap., 1975, vol. 22, N 5, p. 433—437.
- Johansson R. Effect of prolactin, growth hormone and insulin on the uptake and binding of dihydrotestosterone to the cultured rat ventral prostate. — Acta endocrinol., 1976, vol. 81, p. 854.
- Kalra P. S., Kalra S. P. Modulation of hypothalamic luteinizing-hormone-releasing-hormone levels by intracranial and subcutaneous implants of gonadal steroids in castrated rats: effects of androgen and estrogen antagonists. — Endocrinology, 1980, vol. 106, N 1, p. 390—397.
- Kamel F., Krey L. G. Androgen receptors mediate the inhibition of LH secretion by testosterone. — Biol. Reprod., 1980, vol. 22, suppl. 1, A36.
- Kato J. Receptor proteins for androgen and estrogen in the hypothalamo-hypo-

- physeal unit. — In: Brain-Endocrine Interaction II. The Ventricular System. 2-nd Int. Symp., Shizuoka, 1974. Basel: Karger, 1975, p. 217—229.
- Kato J. Ontogeny of 5 α -dihydrotestosterone receptor in the hypothalamus of the rat. — *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 1976, vol. 16, N 3, p. 467—469.
- Kato J., Onouchi T. 5 α -dihydrotestosterone „receptor“ in the rat hypophysis. — *Endocrinol. jap.*, 1973, vol. 20, N 6, p. 641—644.
- Krey L. C., Maclusky N. J., Davis P. G. et al. Different intracellular mechanisms underlie testosterone's suppression of basal and stimulation of cyclic luteinizing hormone release in male and female rats. — *Endocrinology*, 1982, vol. 110, N 6, p. 2159—2169.
- Liao Sh. Molecular action of androgens. — In: Biochemical actions of hormones. N. Y. etc.: Acad. Press, 1977, vol. 4, p. 351—406.
- Liao Sh., Howell D. K., Chang T.-M. Action of nonsteroidal antiandrogen, flutamide, on the receptor binding and nuclear retention of 5 α -dihydrotestosterone in rat ventral prostate. — *Endocrinology*, 1974, vol. 94, N 4, p. 1205—1209.
- Lobl R. T., Schapiro S. Developmental alterations in uptake and retention of ³H-testosterone in female rats. — *J. Endocrinol.*, 1972, vol. 54, N 2, p. 359—360.
- Max S. R. Cytosolic androgen receptor in skeletal muscle from normal and testicular feminization mutant (Tfm) rats. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1981, vol. 101, N 3, p. 792—799.
- Max S. R. Cytosolic androgen receptor in skeletal muscle from normal and dystrophic mice. — *J. Steroid Biochem.*, 1983, vol. 18, N 3, p. 281—283.
- McGill H. C. The heart is a target organ for androgen. — *Science*, 1980, vol. 207, N 4432, p. 775—777.
- McLean W. S., Smith A. A., Hansson Y. et al. Further characterization of the androgen receptor in rat testis. — *Mol. and Cell. Endocrinol.*, 1976, vol. 4, N 4, p. 239—255.
- Minguell J., Valladares L. Molecular aspects on the mechanism of action of testosterone in rat bone marrow cells. — *J. Steroid Biochem.*, 1974, vol. 5, p. 649.
- Moeller H., Koz B., Rödl W. et al. The regulation of cytosolic androgen receptor in rat ventral prostate: Role of the pineal gland in pubertal and mature rats. — *Acta endocrinol.*, 1983, vol. 102, suppl. N 253: Program Main Sess. and Adv. Abstr. Short Pap. 27 Symp., Frankfurt/M. March 2—5, 1983, p. 57—58.
- Monbon M., Loras B., Reboud J. P., Bertrand J. Binding and metabolism of testosterone in the rat brain during sexual maturation. I. Macromolecular binding of androgens. — *J. Steroid Biochem.*, 1974, vol. 5, p. 417—423.
- Mowszowicz I., Melanitou E., Doukani A. et al. Androgen binding capacity and 5 α -reductase activity in pubic skin fibroblasts from hirsute patients. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1983, vol. 56, N 6, p. 1209—1213.
- Mowszowicz I., Riahi M., Wright F. et al. Androgen receptor in human. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1981, vol. 52, N 2, p. 338—344.
- Naess O. Characterization of the androgen receptors in the hypothalamus, preoptic area and brain cortex of the rat. — *Steroids*, 1976, vol. 27, N 2, p. 167—185.
- Naess O., Attramadal A., Aakvaag A. Androgen binding proteins in the anterior pituitary, hypothalamus, preoptic area and brain cortex of the rat. — *Endocrinology*, 1975a, vol. 96, N 1, p. 1—9.
- Naess O., Hansson V., Djeseland O., Attramadal A. Characterization of the androgen receptor in the anterior pituitary of the rat. — *Endocrinology*, 1975b, vol. 97, N 6, p. 1355—1363.
- Naess O., Hauge E., Attramadal A., Aakvaag A. Androgen receptors in the anterior pituitary and central nervous system of the androgen „insensitive“ (Tfm) rat: Correlation between receptor binding and effect of androgens on gonadotropin secretion. — *Endocrinology*, 1976, vol. 99, N 5, p. 1295—1303.
- Neri R., Florance K., Kosiol P., Van Cleave S. A biological profile of a nonsteroidal antiandrogen Sch 13521 (4-nitro-3-trifluoromethylisobutyranilide). — *Endocrinology*, 1972, vol. 91, N 2, p. 427—437.
- Neri R., Peets E., Watnick A. Anti-androgenicity of flutamide and its metabolite Sch 16423. — *Biochem. Soc. Trans.*, 1979, vol. 7, N 3, p. 565—569.
- Neumann F., Steinbeck H. Antiandrogens. — In: Androgens II and antiandrogens. Berlin etc.: Springer, 1974, p. 235—480.
- Ohno S. The Y-linked H-Y antigen locus and the X-linked Tfm locus as major

- regulatory genes of the mammalian sex determining mechanism. — *J. Steroid Biochem.*, 1977, vol. 8, p. 585—592.
- Peets E. A., Henson M. F., Neri R. On the mechanisms of the antiandrogenic action of flutamide (α,α,α -trifluoro-2-methyl-4-nitro-m-propionotoluidide) in the rat. — *Endocrinology*, 1974, vol. 94, N 2, p. 532—540.
- Raynaud J. P., Bonne C., Bouton M.-M. et al. Action of a non-steroid anti-androgen, RU 23908, in peripheral and central tissues. — *J. Steroid Biochem.*, 1979, vol. 11, p. 93—99.
- Rennie P. S., Bruchofsky N. In vitro and in vivo studies on the functional significance of androgen receptors in rat prostate. — *J. Biol. Chem.*, 1972, vol. 247, p. 1546—1554.
- Shain S.A., Boesel R. W., Axelrod H. R. Aging in rat prostate. Reduction in detectable ventral prostate androgen receptor content. — *Arch. Biochem. and Biophys.*, 1975, vol. 167, p. 247—263.
- Smith K., Elvers B., Krieg M. Translocation of the androgen receptor of rat heart muscle and prostate cytosol into heart muscle nuclei. — *Acta endocrinol.*, 1979, vol. 91, Suppl. 225, p. 389.
- Sullivan J. N., Strott C. A. Evidence for an androgen-independent mechanism regulating the levels of receptor in target tissue. — *J. Biol. Chem.*, 1973, vol. 248, p. 3202.
- Tezon J. G., Blaquier J. A. Androgens control androgen-binding sites in rat epididymis. — *J. Endocrinol.*, 1983, vol. 113, N 1, p. 1025—1030.
- Tezon J. G., Vasquez M. H., Blaquier J. A. Androgen-controlled subcellular distribution of its receptor in the rat epididymis: 5α -dihydrotestosterone-induced translocation is blocked by antiandrogens. — *Endocrinology*, 1982, vol. 111, N 6, p. 2039—2045.
- Thieulant M.-L., Benie T., Jouan P. Ontogeny of 5α -androstan- $3\beta,17\beta$ -diol and 17β -estradiol binding to cytoplasm and nuclei of the male rat pituitary. — *Endocrinology*, 1982, vol. 110, N 4, p. 1300—1307.
- Toth M., Zakar T. Relative binding affinities of testosterone, 19-nortestosterone and their 5α -reduced derivatives to the androgen receptor and to other androgen-binding proteins: a suggested role of 5β -reductive steroid metabolism in the dissociation of „myotropic“ and „androgenic“ activities of 19-nortestosterone. — *J. Steroid Biochem.*, 1982, vol. 17, p. 653—660.
- Tremblay R. R., Ho-Kim M. A., Dubé J. Y. Caractérisation partielle et variations du récepteur cytoplasmique des androgènes dans le rein de rat. — *Ann. Endocrinol. (Paris)*, 1983, vol. 44, p. 247—251.
- Tuohimaa P., Niemi M. In vitro uptake of tritiated sex steroids by the hypothalamus of adult male rats treated neonatally with an antiandrogen (cyproterone). — *Acta endocrinol.*, 1972, vol. 71, N 1, p. 45—54.
- Tveter K. J., Unhjem O., Attramadal A. et al. Androgenic receptors in rat and human prostate. — *Adv. Biosci.*, 1971, vol. 7, p. 193—207.
- Van Doorn E., Craven S., Bruchofsky N. The relationship between androgen receptors and the hormonally controlled responses of rat ventral prostata. — *Biochem. J.*, 1976, vol. 160, p. 11—21.
- Wilson J. D., George F. W., Griffin J. E. The hormonal control of sexual development. — *Science*, 1981, vol. 211, N 4488, p. 1278—1284.
- Wilson M. J. Inhibition of development of both androgen-dependent and androgen-independent pigment cells in scrotal skin dermis of the rat by antiandrogen treatment during fetal growth. — *Endocrinology*, 1983, vol. 112, N 1, p. 321—325.
- Wright W. W., Frankel A. J. An androgen receptor in the nuclei of late spermatids in testes of male rats. — *Endocrinology*, 1980, vol. 107, N 1, p. 314—317.
- Yamanaka H., Koya A., Imai K. et al. Effect of AA 560 (a nonsteroidal antiandrogen) implantation in the hypothalamus on gonadotropin secretion in male rats. — *Endocrinol. jap.*, 1981, vol. 28, N 6, p. 819—822.
- Yamanaka H., Matsuoka M., Yuasa H. et al. Effect of antiprostatic agents on 5α -dihydrotestosterone binding to rat hypophyseal and hypothalamic cytosol macromolecules. — *Endocrinol. jap.*, 1979, vol. 26, N 1, p. 97—102.

Глава 6

ИНСУЛИНОВЫЙ РЕЦЕПТОР, ЕГО СТРУКТУРА И ОРГАНИЗАЦИЯ

С начала 70-х годов проблема инсулин-рецепторных взаимодействий не выходит из поля зрения исследователей разных специальностей. Интерес к ней понятен в связи с важностью инсулина в регуляции гомеостаза вообще и в патогенезе сахарного диабета в частности. Помимо этого, сложилось так, что рецептор инсулина, как и сам инсулин, оказался тем субстратом, на котором проверяются многие новые идеи и новые методические подходы, используемые в дальнейшем при исследовании других гормонов и других рецепторов. Сегодня рецепторам инсулина посвящено огромное число работ. Ряд из них принадлежит отечественным авторам. Помимо оригинальных статей на русском языке, имеются и обстоятельные обзоры (Бездробный, 1980, 1981; Кусень, 1982; Кендыш, 1983). Наличие обширной литературы позволяет нам почти не затрагивать феноменологии связывания инсулина рецепторами. В данной работе внимание сосредоточено преимущественно на механизмах, лежащих в основе рецепторной функции. При этом мы исходим из того, что взаимодействие инсулина с рецепторами — это не только первое звено в цепи событий, приводящих к активации клеточного метаболизма, но и первое регулируемое звено в этой цепи. Последнее представляет для физиолога особенно большой интерес.

СТРУКТУРА РЕЦЕПТОРА

Принципиально важные заключения о природе рецептора инсулина были сделаны уже в первых работах, посвященных этому вопросу. Куатреказасом (Cuatrecasas, 1972a, 1972b) было показано, что рецептор является интегральным белком клеточной мембраны, поскольку он может быть извлечен только солиubilизацией в неионных детергентах, а будучи солиubilизированным, сохраняет способность связывать инсулин. Молекулярная масса

солюбилизированного рецептора была найдена равной 300 кД, радиус Стокса — 7.0 нм. Тем же автором была продемонстрирована чувствительность рецептора к нейраминидазе, что свидетельствовало о вхождении в его состав сиаловых кислот. В 1976—1978 гг. были получены доказательства хроматографической неоднородности рецептора и высказано предположение, что он по природе своей является олигомером (Ginsberg et al., 1976; Krupp, Livingston, 1978; Maturro, Holenberg, 1978).

Модель рецептора, каким он представляется сегодня, создана при использовании двух подходов. При первом из них анализу субъединичного состава предшествует выделение рецептора путем солюбилизации и по возможности полная его очистка. Джейкобс с соавт. (Jacobs et al., 1977, 1980), используя в качестве исходного материала плазматические мембраны печени и плацентарные мембраны, очищали солюбилизированные в Тритоне X-100 рецепторы сначала на ДЕАЕ-целлюлозе, а затем аффинной хроматографией на инсулин-агарозных колонках. Материал с колонок при этом смывался мочевиной. Недавно, работая с плацентарными мембранами, Фужита-Ямагуши с соавт. (Fujita-Yamaguchi et al., 1983) добились резкого повышения чистоты получаемого препарата, элюируя материал в более мягких условиях (без мочевины). При таком методе 1 мг выделенного рецепторного белка связывал 28 мкг инсулина против 2.4 мкг в оригинальном методе. Судя по расчетам, это близко к тому, что должен давать гомогенный рецептор.

При втором подходе выделения рецептора не требуется. В этом случае клетки, имеющие рецепторы, инкубируют с инсулином-¹²⁵I в присутствии кросс-сшивающего агента, благодаря чему рецептор связывается с лигандом ковалентной связью. После этого выделяют грубую мембранную фракцию и солюбилизируют ее в детергенте. Этим процедурам достаточно, чтобы получить материал, пригодный для анализа. Для сшивки рецептора с меченым инсулином Пилх и Чех (Pilch, Czech, 1979) используют кросс-сшивающий бифункциональный агент дисукцинимидил суберат. Вип с соавт. (Vip et al., 1978; Vip, Moule, 1983) применяют фотореактивные азидобензольные производные инсулина, которые метят ¹²⁵I, инкубируют с клетками в темноте, а затем высвечивают, чем и достигается их присоединение к рецептору. Ценность этих методов в их простоте и в возможности исследовать структуру рецептора в нативном состоянии, их недостаток — в отсутствии информации об участках молекулы рецептора, непосредственно не вовлеченных в связывание.

Большое место при исследовании структуры рецептора принадлежит методам, объединяющим оба подхода. Использовались лактопероксидазное иодирование клеточной поверхности (Nagrisson, Itin, 1980) или биосинтетическое помечивание клетки с помощью ³⁵S (Van Obberghen et al., 1981). Идентификация меченых рецепторов в обеих методиках достигалась предварительной очисткой солюбилизированного материала на лектин-

агарозных колонках (агглютинин зародыша пшеницы) и окончательной — путем преципитации рецептора антителами к нему. Анализ материала, полученного названными или близкими к ним методами, проводится путем его электрофоретического разделения в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия с последующей радиоавтографией полос. Разгонка проводится до и после применения дитиотрейтола, используемого для разрушения S-S-связей. В отсутствие дитиотрейтола на электрофореграммах выявляются три структуры с молекулярной массой 350, 320 и 290 кД (данные разных авторов при определении молекулярной массы несколько варьируют). Добавление редуцирующего агента приводит к распаду структур на субъединицы.

Из субъединиц рецептора наиболее отчетливо выявляемой является субъединица с молекулярной массой 125 (130) кД. В высокоочищенном препарате рецептора на ее долю приходится 72 % (Fujita-Yamaguchi, 1984). С меньшим постоянством и в меньшем количестве (18.5 %) выявляется субъединица с массой 90 кД. Эта субъединица очень чувствительна к протеолитическому перевариванию (Massague et al., 1981) и поэтому часто представлена в виде фрагмента 45 (49) кД. Принято большую субъединицу обозначать α -субъединицей, меньшую — β , а ее фрагмент 45 кД — β_1 -субъединицей. Принадлежность всех трех компонентов инсулиновому рецептору подтверждается возможностью преципитировать их антирецепторными антителами (Harrison, Itin, 1980; Jacobs et al., 1980). Чех и Массаги (Czech, Massague, 1982) предложили модель, согласно которой инсулиновый рецептор представляет собой гетеротетрамер, состоящий из двух α - и двух β -субъединиц, ковалентно соединенных дисульфидными связями. Наименьшей единицей интактного рецептора является структура 350 кД, имеющая формулу $(\alpha\beta)(\alpha\beta)$. Две другие структуры, выявляемые в нередуцированных гелях, отличаются от нее тем, что β -субъединица представлена в них своим β_1 -фрагментом: структура 320 кД построена по формуле $(\alpha\beta)(\alpha\beta_1)$, структура 290 кД — $(\alpha\beta_1)(\alpha\beta_1)$. Все три структуры способны связывать инсулин, не отличаясь в этом отношении ни друг от друга, ни от рецептора интактных мембран (Legera, Livingston, 1983). Возможно, что ограниченный протеолиз β -субъединиц имеет место не только *in vitro*, но и *in vivo*. В этом случае производные формы рецепторной молекулы могут рассматриваться как продукт ее физиологического лизосомального процессинга (Czech, Massague, 1982).

Вопрос о дисульфидных связях рецептора заслуживает специального рассмотрения. Эти связи объединяют не только α -субъединицу с β -, но и пары субъединиц друг с другом. Рецептор как бы прошит дисульфидными связями. Чех и Массаги относят связи между двумя половинами рецептора к связям 1-го класса, которые отличаются тем, что легко поддаются разрушению. Связь между большой и малой субъединицами исследователи относят к связям 2-го класса, их отличает устойчивость: дитиотрейтол разрушает их только после предварительной обработки рецептора протео-

литическими ферментами типа эластазы. Еще один класс S-S связей был выявлен в адипоцитах, но отсутствовал в печеночных клетках. Связи этого класса чувствительны как к редуцирующим (дитиотрейтол), так и к тиоловым (N-этилмаленимид) агентам. Предполагается, что они ответственны за удержание рецепторов в группах по 5-6, что имеет место в жировых, но не в печеночных мембранах. Таким образом, эти связи скорее характеризуют общую организацию мембраны адипоцита, чем рецептор, как таковой.

Модель рецептора как гетеротетрамера, построенного из двух видов субъединиц, на сегодняшний день вполне удовлетворительно объясняет экспериментальные данные, хотя некоторые детали еще предстоит уточнить. Так, остается неясным, относятся ли к самому рецептору минорные субъединицы с молекулярной массой 40 и 65 кД, выявленные некоторыми авторами (Вагон, Sönksen, 1983; Vip, Moule, 1983). Они не являются производными β -субъединицы, и функция их не установлена. Не исключено, что речь идет об ассоциированных с рецептором мембранных белках.

Рецептор инсулина является гликопротеином. Наличие углеводного компонента в его структуре обуславливает возможность извлекать его с помощью лектинов, о чем уже шла речь. Также упоминалось о чувствительности рецептора к нейраминидазе, что указывает на вхождение в его состав сиаловых кислот. В более поздних работах углеводный компонент изучался таким методом, как биосинтетическая метка рецептора с помощью меченных тритием простых сахаров, применяемая в сочетании с поверхностным мечением по галактозе (Van Obberghen et al., 1983a), а также путем зондирования рецептора спектром гликозидаз и лектинов (Сагон et al., 1983). Основные результаты этих исследований сводятся к тому, что в состав обеих субъединиц входят углеводные цепи комплексного типа с N-гликозидной связью. Помимо сиаловых кислот, компонентами этих цепей являются остатки галактозы, маннозы, N-ацетил-D-галактозамина и / или галактозила. Частично углеводные остатки располагаются на поверхности клетки. Углеводы, входящие в состав большой и малой субъединиц рецептора, неидентичны. Так, сиаловых кислот больше в малой субъединице, чем в большой.

В заключение следует сказать о синтезе рецепторной молекулы. При исследовании субъединичного состава инсулинового рецептора в лимфоцитах IM-9 и в адипоцитах ТЗТ-L1 линии (Deutsch et al., 1983; Hedo et al., 1983; Kasuga et al., 1982a) был выявлен компонент, который подобно обычным субъединицам метился биосинтетической меткой, солюбилизировался в Тритоне X-100 и осаждался антирецепторными антителами. Однако от обычных субъединиц его отличали большая величина молекулы (молекулярная масса 180—190 кД) и повышенное содержание маннозных остатков; с другой стороны, ряд других обычных для инсулинового рецептора моносахаридов в нем не выявлялся. Судя по опытам с поверхностным мечением, компонент имел внутриклеточную локализацию.

Происхождение белка исследовали в опытах с моноамином, ионофором, ингибирующим посттрансляционное созревание белков. При инкубации клеток с этим соединением компонент 190 кД накоплялся, тогда как обычные субъединицы при электрофорезе переставали выявляться (Jacobs et al., 1983). Это наводило на мысль о том, что исследуемый белок представляет собой биосинтетический предшественник инсулинового рецептора, его проторецептор. Подтверждение было найдено в опытах с пульсовой биосинтетической меткой рецептора ^3H -маннозой (Hedo et al., 1983). Компонент 190 кД появлялся раньше обычных субъединиц (максимум его накопления наблюдался через 1 ч, обычных же субъединиц — через 5—6 ч) и имел период полужизни всего 2.5 ч. Все вместе взятое позволило заключить, что инсулиновый рецептор синтезируется как одна богатая маннозными остатками полипептидная цепь с молекулярной массой 180—190 кД, которая на пути от места синтеза к мембране (вероятно, в аппарате Гольджи и в плазматическом ретикулуме) подвергается окончательному углеводному процессингу и протеолитическому перевариванию, чтобы дать начало двум субъединицам — 130 и 90 кД. Иногда протеолитическое расщепление не происходит, и тогда наряду с этими субъединицами при электрофорезе выявляется компонент с молекулярной массой 210 кД. Это предшественник, подвергшийся гликозилированию, но сохранивший одноцепочечную структуру.

Синтез субъединиц рецептора через большую одиночную цепь, как известно, типичен для многих белков. В частности, нельзя не отметить сходство синтеза рецептора с синтезом самого инсулина. Как и для инсулина, для рецептора существует один вид мРНК и один ген.

Рецептор инсулина как антиген. Как всякий белок, инсулиновый рецептор обладает антигенными свойствами, и, следовательно, на него могут вырабатываться антитела. Сегодня такого рода антитела являются важнейшим инструментом в руках исследователей как при изучении самого рецептора, так и при выяснении механизма действия инсулина. Специально надо отметить значение антител к рецептору для его идентификации, в частности, использование иммунопреципитации при выделении рецептора и его очистке (Harrison, Itin, 1980).

Антитела к инсулиновому рецептору первоначально были обнаружены в крови больных с тяжелой инсулинрезистентностью, сочетавшейся с гиперинсулинемией, нарушенной толерантностью к глюкозе и кожной симптоматикой, известной как «черный акантоз» (Flier et al., 1975).

В основе заболевания лежит генерализованный аутоиммунный процесс, одним из проявлений которого и является выработка антител к рецептору инсулина (Muggeo et al., 1979b). Сыворотка крови больных или выделенный из нее иммуноглобулин IgG пока остаются основным материалом, доступным исследователям. Обычный способ получения антител путем иммунизации животных в данном случае не нашел большого распространения, так как

иммунизация требует большого количества обогащенного рецепторами материала. Тем не менее в последнее время сообщено о получении антител к рецептору при иммунизации некоторых линий мышей очищенным аффинной хроматографией препаратом рецептора из плаценты человека (Kull et al., 1982), а также культурой человеческих лимфоцитов IM-9 в стадии экспоненциального роста, когда количество инсулиновых рецепторов в клетках очень велико (R. Roth et al., 1982). В обоих случаях антитела были клонированы, и сегодня рецептор изучается с помощью не только поликлональных аутоантител, но и моноклональных гетероантител.

Антитела связываются с рецепторами и тем самым блокируют связывание рецепторами инсулина. То, что взаимодействие происходит именно с рецепторами, доказывается распределением меченых ^{125}I антител в соответствии с концентрацией рецепторов в клетках (Jagret et al., 1976), количественной преципитацией антителами солюбилизованных рецепторов, способностью их распознавать в рецепторе те же субъединицы, которые выявляются другими методами (см. выше). Эффект антител дозозависим: чем их больше в инкубационной среде, тем меньше связывается рецепторами инсулина- ^{125}I .

Отличительным свойством антител к рецептору инсулина является их способность при связывании с рецепторами *in vitro* воспроизводить широкий спектр инсулиновых эффектов в чувствительных к гормону клетках (Kahn et al., 1981). Исключением, по-видимому, является лишь способность гормона стимулировать включение ^3H -тимидина в ДНК фибробластов. Возможно, это связано с тем, что влияние инсулина на геном клетки реализуются не через инсулиновый рецептор, а через рецепторы ростовых факторов (King et al., 1980).

Антитела обладают инсулиноподобной активностью благодаря тому, что они вызывают агрегацию рецепторов (Kahn et al., 1978). Условием этого является их двухвалентность: моновалентные Fab' -фрагменты антител биологически неактивны, но становятся активными после введения в среду второго антитела, восстанавливающего состояние двухвалентности. Инсулин также вызывает агрегацию рецепторов, но в физиологических концентрациях он является мономером, т. е. одновалентен. Вероятно, в случае действия на клетку инсулина агрегация рецепторов инициируется другим путем, чем в случае антирецепторных антител. Вообще вопрос об идентичности механизмов активации клеточного ответа антителами к рецептору и инсулином нуждается в дополнительном изучении, особенно в свете недавно выявившихся различий в действии того и другого агента на фосфорилирование рецептора.

В отличие от поликлональных антирецепторных антител моноклональные не обладают свойством воспроизводить эффекты гормона и, более того, ингибируют их (R. Roth et al., 1982, 1983b). Предложены два объяснения этого: либо поликлональная антисыворотка содержит два вида антител, среди которых стимулируют

ющие преобладают над блокирующими, либо моноклональные антитела, подобно одновалентным фрагментам поликлональных, неспособны вызывать агрегацию рецепторов.

То, что антирецепторные антитела действуют на клетку подобно инсулину, должно означать, что специфическая информация, необходимая клетке, заключена в самом рецепторе, а гормон выполняет лишь функцию запуска системы. Однако это положение, по-видимому, не совсем верно. Ковалентно сшитый с рецептором холерного токсина инсулин действовал как инсулин на тимоциты и на клетки HTS гепатомы крыс, хотя и был «представлен» клеткам через «чужой» рецептор. Действуя на эти же клетки через собственные рецепторы, гормон по сравнению с гибридной молекулой был менее активным, так как количество инсулиновых рецепторов в клетках очень мало (Roth, Maddux, 1983). Сходные результаты были получены и с другим гибридом — инсулином, сшитым ковалентно с рицином В (Hofmann et al., 1983).

Рецепторы инсулина в иммунологическом отношении неоднородны. Выявлены различия в иммунных свойствах рецепторов в ряду позвоночных (Muggeo et al., 1979a). Это тем более интересно, что по связывающим характеристикам рецепторы позвоночных близки друг к другу. Если брать только млекопитающих, то у них с помощью моноклональных антител (очевидно, более специфичных) выявляются различия между рецепторами человека и крысы и даже между рецепторами разных тканей человека (R. Roth et al., 1982, 1983b). Поликлональные антитела выявляют различия между мозговыми и периферическими рецепторами крысы (Heidenreich et al., 1983).

Используя набор антирецепторных сывороток в качестве зондов, можно было бы многое прояснить в функциональной топографии рецепторной молекулы. Однако пока этот подход применяется мало. Имеются данные о том, что по крайней мере некоторые антигенные детерминанты располагаются в отдалении от инсулин-связывающих мест молекулы (Baldwin et al., 1980). По-видимому, именно они обуславливают межвидовые различия между рецепторами. Уточнение локализации детерминант, очевидно, станет более легким, когда будет получен широкий набор моноклональных антител.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ РЕЦЕПТОРА

Как известно, рецептор связывает гормон и передает полученную этим путем информацию клетке, вызывая с ее стороны специфичный для данного гормона ответ. До недавнего времени наши знания о рецепторе инсулина базировались почти исключительно на анализе функции связывания. Сегодня наметилась возможность независимо от связывания изучать некоторые метаболические изменения, происходящие в рецепторе при действии на него инсулина. Это оказалось важным для понимания после-

дующих за связыванием ступеней в действии гормона, но кроме того, много дало для понимания самой организации рецептора. Однако вначале остановимся на некоторых моментах, имеющих отношение к функции связывания.

1. Связывание инсулина рецептором характеризуют специфичность, насыщенность, высокое сродство (K_{aff} порядка 10^9 — 10^{10} M^{-1}), чувствительность к изменениям температуры и рН, а также неклассическая кинетика, о чем можно судить по нелинейной форме графика Скэтчарда. Как показали Лерэ и Ливингстон (Lerea, Livingston, 1983), всеми этими свойствами обладает популяция белков клеточной мембраны — собственно инсулиновый рецептор (молекулярная масса 350—360 кД) и его производные с молекулярной массой 300—320 и 260—290 кД. Обращает на себя внимание тот факт, что рецепторы инсулина в головном мозгу крысы имеют те же связывающие параметры, что и рецепторы других органов (Navranova et al., 1978), и что рецепторы этой локализации сохраняют эти параметры неизменными на протяжении эволюции позвоночных (Лейбуш, 1983). Тем не менее между мозговыми рецепторами и остальными имеются структурные различия, касающиеся размеров субъединиц, состава углеводов и различий в антигенных свойствах (Heidenreich et al., 1983). С одной стороны, это означает, что в структуре рецепторной молекулы возможны «допуски», в пределах которых функция связывания не претерпевает ущерба, с другой стороны — наводит на мысль о том, что в связывающем домене рецептора имеется инвариантный локус, характеризующийся высоким эволюционным консерватизмом.

2. Собственно связывающей инсулин субъединицей рецептора является α -субъединица. Это следует из того, что именно в ней в основном определяется инсулин- ^{125}I , ковалентно связанный с рецептором с помощью кросс-сшивающих агентов. В то же время имеются данные о том, что минимальной структурой, еще способной связывать инсулин, является не сама эта субъединица, а димер $\alpha\beta$, в составе которого α -субъединица, очевидно, сохраняет большую конформационную стабильность (Pollet et al., 1982). Димер $\alpha\beta$ вызывает интерес и в том отношении, что он, подобно полному рецептору, может обеспечить передачу гормонального сигнала на эффекторные системы клетки (Czech, Massague, 1982). Таким образом, димер рецептора в функциональном отношении оказывается как бы равным тетрамеру $\alpha_2\beta_2$. Из этого как будто бы следует, что инсулиновый рецептор имеет две валентности и может связать две молекулы гормона. Чтобы выяснить, действительно ли это так, была предпринята попытка использовать для ковалентной метки рецептора две по-разному детектируемые разновидности инсулина (меченный ^{125}I и нерадиоактивный битинолинсулин). опыты показали, что одновременное связывание рецептором двух меток невозможно по причине того, что оккупация одной связывающей единицы рецептора блокирует связывающую способность второй (Pang, Shafer, 1983). Авторы выдвигают предположение о наличии

между двумя связывающими структурами рецепторной молекулы необычайно высокой отрицательной кооперативности, благодаря которой стехиометрия связывания 1 : 1 является единственно возможной. В этих исследованиях вопрос о стехиометрии связывания приобретает новый ракурс, который, возможно, приведет к новому пониманию того, как организован связывающий домен рецептора.

3. Наиболее сложным при изучении связывающей функции рецептора остается вопрос о причинах нелинейности графика Скэтчарда. Этот вопрос требует более обстоятельного рассмотрения.

Анализ Скэтчарда (Scatchard, 1949), как хорошо известно, является основным методом обработки первичных данных, характеризующих связывание в состоянии равновесия. Классическая зависимость Скэтчарда — прямая линия на графике — получается при связывании лиганда одной популяцией гомогенных некооперирующих рецепторов. Наклон этой линии определяется величиной константы аффинности, а ее пересечение с горизонтальной осью происходит в точке, в большей или меньшей степени соответствующей максимальному числу связывающих мест. В случае рецепторов инсулина на графике Скэтчарда получается линия, вогнутая вовнутрь. Принято считать, что такая линия образуется либо вследствие отрицательной кооперативности между рецепторами, либо вследствие того, что рецепторы существуют в виде гетерогенной популяции связывающих мест, различающихся по своей аффинности.

Когда говорят об отрицательной кооперативности, имеют в виду, что оккупация инсулином части рецепторов приводит к понижению сродства к гормону всех рецепторов, тем большему, чем больше рецепторов оккупировано (De Meyts et al., 1973). Константа аффинности с этой точки зрения не существует как фиксированная величина, ибо она меняется при каждом уровне оккупации рецепторов. Эту ситуацию и отражает график Скэтчарда — его кривизна есть результат уменьшения константы аффинности по мере увеличения числа оккупированных мест связывания (De Meyts, Roth, 1975).

С точки зрения концепции гетерогенности связывающих мест инсулин при относительно небольших концентрациях может связаться только с высокоаффинными (более чувствительными) рецепторами, а при более высоких концентрациях — также и с низкоаффинными (менее чувствительными). Криволинейность графика Скэтчарда отражает последовательность оккупации тех и других мест гормоном по мере увеличения его концентрации. Согласно двухрецепторной модели, константа аффинности для высоко- и низкоаффинных рецепторов является постоянной величиной и для каждого класса должна рассчитываться отдельно (Kahn et al., 1974).

Со всей определенностью нужно сказать, что на сегодняшний день ни то, ни другое объяснение не может быть принято безусловно.

Концепция отрицательной кооперативности, поначалу имевшая много сторонников, в настоящее время оценивается довольно сдержанно. Каковы причины этого? Прежде всего, было подвергнуто сомнению объяснение основного факта, на котором, собственно говоря, концепция держится. Факт заключается в том, что в присутствии немеченого инсулина связанный с рецепторами инсулин-¹²⁵I диссоциирует более быстро. Согласно Де Мейтсу, дело здесь в том, что немеченный инсулин иницирует кооперативный эффект. Он оккупирует свободные рецепторы, что приводит к снижению аффинности всего рецепторного пула. В результате меченому инсулину легче отсоединиться от связавшего его рецептора, что и находит отражение в более интенсивной по сравнению с контролем его диссоциации. Было показано, что скорость диссоциации инсулина-¹²⁵I определяется концентрацией немеченого гормона и временем инкубации с ним, т. е. как будто бы зависит от уровня занятости рецепторов. Но это, по всей видимости, не так. Уровень занятости рецепторов можно изменить, увеличивая концентрацию не только немеченого, но и меченого инсулина, если инкубировать его с мембранами до начала диссоциации. Но, как было установлено, изменение концентрации меченого лиганда в десятки раз не отражается на степени ускорения диссоциации при последующем добавлении в инкубационный раствор немеченого гормона. Следовательно, скорость диссоциации метки определяет не уровень занятости рецепторов, а концентрация свободного инсулина в растворе. Кооперативный эффект инсулина в этих обстоятельствах не очевиден (Pollet et al., 1977; Frank, Davidson, 1981).

Далее оказалось, что пробу Де Мейтса — ускорение диссоциации метки нативным инсулином — можно вызвать или модифицировать путем воздействия на мембрану, а не на рецептор. Так, обработка плацентарных мембран фосфолипазой С вызывала появление положительной пробы в случае дезоктапептидинсулина, аналога, который в принципе не влияет на диссоциацию связанного гормона (Clark et al., 1980b). Наконец, был получен аналог инсулин-[Лей^{B25}], не вызывающий кооперативного эффекта, но при связывании с адипоцитами крысы дающий типичный криволинейный график Скэтчарда (Green et al., 1983).

Концепция отрицательной кооперативности отвергается многими и на том основании, что альтернативная модель (два независимых класса рецепторов, различающихся по сродству к гормону) лучше объясняет многие факты. Ингибирование связывания инсулина лектинами сопровождалось спрямлением графика Скэтчарда за счет элиминации высокоаффинных рецепторов; низкоаффинные места связывания при этом не претерпевали изменений (Herzberg et al., 1980; Capon et al., 1983). Аналогичная картина была выявлена при обработке кардиоцитов крысы ЭДТА (Eckel, Reinauer, 1984). Стимуляция транспорта аминокислот и стимуляция Na/K-АТФазной активности в гепатоцитах крысы была обусловлена оккупацией гормоном только высокоаффинных

связывающих мест (Fehlmann et al., 1981). Наоборот, стимуляция транспорта аминокислот в сердечной мышце куриного эмбриона реализовалась через низкоаффинные рецепторы (Santora et al., 1979). С позиций двухрецепторной модели проще описывается и картина изменений аффинности рецепторов эритроцитов в онтогенезе кур: динамика наблюдалась только со стороны высокоаффинных рецепторов, тогда как низкоаффинные не изменялись на всем протяжении онтогенеза (Лейбуш и др., 1984).

В свою очередь двухрецепторная модель имеет тот существенный недостаток, что структуры, которые можно было бы идентифицировать как высокоаффинные или низкоаффинные рецепторы, пока не обнаружены. Как уже говорилось, олигомерные структуры разной молекулярной массы, которыми рецептор представлен в мембране, связывая инсулин, дают криволинейный график Скэтчарда, неотличимый от того, который получается при связывании гормона интактными мембранами. Интерес для поисков представляет высокоочищенный препарат рецептора, полученный Фужита-Ямагуши и др., в котором также выявлена гетерогенность (Fujita-Yamaguchi, 1984), однако данных за то, что какие-то его компоненты можно отождествить с рецепторами разных классов, пока нет. Таким образом, двухрецепторная модель пока также остается проблематичной.*

По-видимому, кинетика инсулин-рецепторного взаимодействия еще долго будет предметом дискуссий. Вероятно, вопрос станет решаться на базе более детального анализа событий, происходящих в самом рецепторе при связывании инсулина, с учетом взаимодействия рецептора с его мембранным окружением. Практически расчет констант аффинности сегодня производится как на основании модели отрицательной кооперативности, так и на основании двухрецепторной модели. Однако в любом случае требуется осторожность в выводах.

Рецептор инсулина как протеинкиназа. Многие свидетельствует о том, что действие ряда гормонов, в том числе инсулина, осуществляется путем их влияния на реакции фосфорилирования-дефосфорилирования в клетках-мишенях (Denton et al., 1981). Закономерно поэтому, что именно эти реакции привлекли внимание исследователей, пытавшихся выяснить, какие биохимические изменения происходят в мембране клетки непосредственно после связывания гормона. В частности, их интересовал вопрос, куда включается фосфор при действии гормона на клеточную мембрану, инкубируемую с меченой по ^{32}P АТФ. Результатом опытов, поставленных вначале с эпидермальным фактором роста (Cagreter et al., 1978), а затем с инсулином (Kasuga et al., 1982b), было открытие того, что гормоны стимулируют фосфорилирование

* Заслуживает внимания точка зрения Доннера и Корина (Donner, Corin, 1980), полагающих, что низкая и высокая аффинность являются двумя равновесными состояниями одной и той же рецепторной молекулы.

собственных рецепторов. В случае инсулина объектом реакции оказалась субъединица 95 кД (β-субъединица).

Реакция фосфорилирования предполагает наличие протеинкиназы, которую и активирует инсулин. Судя по тому, что гормон стимулирует фосфорилирование β-субъединицы при действии на интактные клетки, плазматические мембраны и даже на солюбилизованные рецепторы, протеинкиназа тесно ассоциирована с рецепторным белком. Речь может идти о загрязнении препарата рецептора протеинкиназной активностью при выделении или о том, что протеинкиназа входит в рецептор как его интегральный компонент. Все свидетельствует в пользу правильности последнего предположения: отделить протеинкиназную активность от рецептора не удастся даже при очень высокой степени его очистки (Kasuga et al., 1983b); протеинкиназная активность преципитируется антителами к рецептору, включая моноклональные (Roth, Cassell, 1983); в β-субъединице рецептора идентифицирован АТФ-связывающий белок, блокада которого ингибитором устраняет способность инсулина стимулировать фосфорилирование субъединицы (Van Obberghen et al., 1983b). Итак, рецептор, а именно его малая субъединица, демонстрирует свойства и протеинкиназы, и субстрата реакции фосфорилирования. То, что происходит при связывании инсулина рецептором, может быть, таким образом, обозначено, как автофосфорилирование рецептора (Avruch et al., 1982; Grigorescu et al., 1983; Grunberger et al., 1983; Kasuga et al., 1982b, 1982c, 1983b, 1983c; Van Obberghen et al., 1983).

Типичный эксперимент по изучению фосфорилирования рецептора включает такие стадии, как инкубация клеток или бесклеточных систем с инсулином в присутствии γ - ^{32}P АТФ, солюбилизация рецепторов, их очистка и электрофоретическое разделение с последующей идентификацией полос, в которые включается ^{32}P . В подобных опытах показано, что инсулин активирует реакцию путем увеличения ее скорости. Его эффект при этом специфичен, градуально возрастает при увеличении концентрации гормона, а в случае гетерологичных инсулинов или его аналогов пропорционален их сродству к рецептору. Протеинкиназную активность стимулирует трипсин в дозах, вызывающих инсулиноподобный эффект, а также ионы Mn^{2+} , тогда как циклические нуклеотиды на активность фермента не влияют. Протеинкиназная активность тетрамера рецептора выше, чем димера, т. е. нативность рецептора есть условие оптимального протекания реакции (Shia et al., 1983).

В опытах на интактных клетках инсулин стимулировал включение ^{32}P в аминокислотные остатки как серина, так и тирозина, но в солюбилизованных рецепторах единственным продуктом реакции является фосфотирозин. Следовательно, инсулиновый рецептор может быть определен как инсулинзависимая, тирозин-специфичная протеинкиназа. К этому классу протеинкиназ относят также рецепторы эпидермального, тромбоцитарного и инсулиноподобного I факторов роста. В регуляции клеточного метаболизма

тирозин-специфичным протеинкиназам может принадлежать важная роль, определяемая тем, что при действии гормона они способны фосфорилировать не только белки рецептора, но и другие белковые субстраты. Так, инсулин стимулировал включение ^{32}P из меченой по фосфору АТФ в гистоны, казеин и синтетические пептиды, добавленные в инкубационную среду, при этом во всех случаях фосфорилирование шло по тирозину. На основании такого рода экспериментов высказывается предположение, что автофосфорилирование рецептора является посредником между инсулином и цепью фототрансферазных реакций с экзогенными субстратами. Действие инсулина, согласно этой точке зрения, сводится к инициации каскада таких реакций, что в конечном счете вызывает специфический ответ клетки на гормон. Так ли это на самом деле и является ли автофосфорилирование рецептора необходимым для осуществления эффектов гормона, подлежит дальнейшему изучению. В последнее время появились сообщения о том, что некоторые пулы антирецепторной антисыворотки, хотя и обладают инсулиноподобным действием, но не активируют протеинкиназу рецептора (Simpson, Hedo, 1984; Zick et al., 1984). Эти факты ставят перед исследователями новые вопросы. Дают ли они основание отрицать роль автофосфорилирования рецептора в механизме действия инсулина, пока неясно. Во всяком случае несомненным является то, что активация инсулином протеинкиназы β -субъединицы рецептора является первым метаболическим событием после связывания гормона. Нет оснований сомневаться в том, что для функционального состояния рецептора это событие не проходит без последствий.

Итак, мы знаем, что связывание инсулина α -субъединицей является импульсом для автофосфорилирования β -субъединицы. Данные, полученные при обработке рецепторов такими вызывающими деструкцию агентами, как коллагеназа (R. Roth et al., 1983c) и эластаза (Shia et al., 1983), показывают, что оба фермента не действовали на α -субъединицу, но разрушали β -субъединицу. В результате рецептор, сохраняя связывающую способность, полностью терял протеинкиназную активность. Эти опыты демонстрируют возможность разобщения функции связывания и функции фосфорилирования и приводят к выводу о том, что субъединицы рецептора представляют собой домены с сепаратными функциями. Встает вопрос о том, каким образом осуществляется коммуникация между этими доменами. Наиболее просто было бы полагать, что связывание инсулина приводит к изменению конформации α -субъединицы, что служит непосредственным стимулом к активации протеинкиназы. И, действительно, изменение конформации является наиболее ранним событием при связывании инсулина рецептором. Об этом говорит изменение чувствительности рецепторов к переваривающему действию трипсина при связывании гормона (Pilch, Czech, 1980), а также в ходе диссоциации связанного гормона (Donner, Yonkers, 1983). Конформационные сдвиги можно было предполагать и на основании

опытов с радиационной инактивацией свободного и оккупированного рецепторов (Harmon et al., 1981). Все указывает на то, что конформационная подвижность является важным элементом функциональной организации молекулы рецептора.

РЕЦЕПТОР ИНСУЛИНА В СИСТЕМЕ СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВЯЗЕЙ КЛЕТОЧНОЙ МЕМБРАНЫ

Связывание рецептором инсулина происходит на поверхности клетки, и состояние клеточной мембраны, в которую рецептор включен как интегральный белок, накладывает на его функцию определенный отпечаток. Прежде всего, здесь должна быть отмечена роль микроокружения рецептора. Есть основания считать белки, составляющие это окружение, и липидный матрикс, в который интегрирован рецептор, факторами, играющими определенную роль в регуляции его связывающей и, следовательно, метаболической активности. Вторым, не менее важным обстоятельством является то, что в жидкокристаллической мембране рецептор подвижен, способен образовывать агрегаты, обеспечивая тем самым такой важный феномен, как интернализация инсулина. Роль рецептора в регуляции гормонального сигнала на мембранном уровне не может быть понята без учета условий, в которых происходит связывание рецептором инсулина, и факторов, определяющих судьбу гормон-рецепторных комплексов.

Белки, регулирующие аффинность рецептора. Наши сегодняшние представления о структуре рецептора базируются на результатах опытов с их экстрагированием детергентом, т. е. при их вычленении из естественного окружения. О состоянии рецептора в нативной мембране мы знаем относительно мало. Так, пока еще плохо охарактеризованы белки, составляющие мембранное окружение рецептора. Их роль как физиологических регуляторов связывания еще предстоит уяснить. Одним из таких белков является гликопротеин, экстрагированный из плазматических мембран печени и некоторых других тканей крысы (Maturo, Holenberg, 1978). В отсутствие его при взаимодействии с инсулином солюбилизированный рецептор трансформируется в низкомолекулярную (радиус Стокса 3.8 нм) форму, характеризующуюся простой кинетикой связывания (линейный график Скэтчарда) и относительно низкой аффинностью. Добавление белка стабилизирует структуру рецептора, возвращая ему нативные гидродинамические (радиус Стокса 7.8 нм) и связывающие (нелинейный график Скэтчарда) характеристики. О диссоциации рецептора при связывании им инсулина сообщалось неоднократно (Ginsberg et al., 1976; Krupp, Livingston, 1978), однако наши сегодняшние знания о рецепторе позволяют думать, что в интактной мембране на такого рода перестройки наложены ограничения. Вероятно, одним из факторов, стабилизирующих рецептор в мембране, является рассматриваемый гликопротеин. В то же время нельзя исключить того, что его ассоциация

с рецептором динамична и это может обусловить небольшие изменения связывания инсулина. Таким образом, в данном белке можно видеть потенциальный регулятор аффинности рецептора.

Вывод о существовании специального регулятора аффинности рецептора был сделан на основании опытов по радиационной инактивации рецепторов плазматических мембран печени крысы (Harmon et al., 1980). Опыты состояли в определении связывания мембранами инсулина-¹²⁵I после облучения их в ядерном реакторе. В ответ на увеличение дозы радиации в мембранах уменьшалось число связывающих мест, что было обусловлено разрушением рецепторов, однако этому предшествовало повышение их аффинности, имевшее довольно сложную динамику. Анализ аномалии привел к представлению о регуляторном белке, который при ассоциации со связывающим доменом рецептора вызывает понижение его сродства к инсулину и тем самым выступает как ингибитор связывания. Некоторые свойства этого белка охарактеризованы. Показана, в частности, его чувствительность к обработке трипсином, а также возможность быть отделенным от связывающего компонента путем лектин-аффинной хроматографии. В нем обнаружены дисульфидные связи, критически важные для его функции. Природа взаимодействия регулятора с рецептором пока не совсем ясна. В последней работе (Harmon et al., 1983) авторы говорят о нем как о структурно обособленном белке, связанном с рецептором нековалентными взаимодействиями. Физиологическое значение регулятора, в частности его роль в контроле клеточного ответа на инсулин, пока не выяснено.

Как сказано, взаимодействие регулятора аффинности с рецептором понижает сродство рецептора к инсулину, тогда как ассоциация мембранного гликопротеина с рецептором повышает ее. Таким образом, аффинность рецептора в мембране модулируется двумя разными белками.

И н с у л и н о в ы й р е ц е п т о р и л и п и д ы м е м б р а н ы. Подобно другим интегральным белкам инсулиновый рецептор должен испытывать на себе влияние физико-химических сдвигов в липидном бислое мембраны. Этот вопрос исследовался путем определения связывающих параметров рецептора в условиях естественных изменений липидного матрикса (онтогенез, некоторые культуры клеток), при воздействиях, изменяющих его свойства (изменения температуры, обработка фосфолипазами), а также в модельных опытах по реконструкции липидного окружения рецептора. При всех подходах определенно выявляется зависимость связывания инсулина от состояния липидов мембраны, хотя факторы, которые эту зависимость определяют, не всегда ясны.

Связывающие характеристики рецептора в первую очередь сопоставлялись с таким интегральным показателем физико-химического состояния липидного матрикса, как его жидкость. Исходным постулатом здесь была схема Шиницкого (Shinitzky, Henkart, 1980), в соответствии с которой понижение жидкости

делает белок более доступным для взаимодействий с клеточным окружением, поскольку в вязкой мембране он как бы выдавливается в водную фазу, а повышение жидкости, разжижение мембраны, имеет обратный результат, поскольку в этом случае белок как бы утоплен в липидах. Прилагая эту схему к инсулиновым рецепторам, следовало ожидать в более вязкой мембране большего числа рецепторов и соответственно большего связывания инсулина. Некоторые данные подтверждают эту схему. Повышение мембранной жидкости адипоцитов крысы, которое было вызвано повышением температуры клеток с 25 до 37 °С, сопровождалось значительным понижением связывания за счет уменьшения числа доступных рецепторов (Amatruda, Finch, 1979). Количество рецепторов инсулина в моноцитах новорожденных детей было в 4 раза выше, чем у взрослых, а жидкость мембран в 6 раз ниже (Neufeld, Corbo, 1982a). Точно так же в мембранах легочной ткани плодов кроликов большая, чем у взрослых, микровязкость сочеталась с большим числом рецепторов и с более высоким связыванием инсулина (Neufeld, Corbo, 1982b). В других случаях схема Шиницкого не работает. Так, в растущих клетках эритролейкемии Френда повышение числа рецепторов и одновременное понижение их аффинности сочетались с повышением степени ненасыщенности фосфолипидов и, следовательно, с более высокой жидкостью мембран (Ginsberg et al., 1981).

Довольно пестрыми оказываются результаты экспериментов по модулированию жидкости липидов мембран. При обработке клеток фосфолипазой С на первый план выступало повышение аффинности рецепторов и, как следствие, повышение связывания инсулина. Как было показано на плацентарных мембранах (Clark et al., 1980a), при 24 °С аффинность повышается в результате замедления фосфолипазой скорости диссоциации связанного инсулина. При такой же температуре в случае печеночных мембран Мак-Калемом и Доннером отмечено удлинение фазы медленной и сокращение фазы быстрой диссоциации, при этом авторы приходят к заключению, что эффект фермента обусловлен его способностью вызывать гидролиз полярных головок фосфолипидов. Это видно из того, что фосфолипазы А₂ и Д, имеющие в отличие от фосфолипазы С другие точки приложения в фосфолипидах мембраны, на связывание инсулина рецепторами не влияли (McCaleb, Donner, 1981). Увеличение аффинности при действии фосфолипазы С, разжижающей липиды, соответствует понижению аффинности рецепторов фибробластов линии 3Т3-L1 при их инкубации в среде с повышенным содержанием насыщенных кислот, т. е. в условиях повышенной микровязкости мембраны (Grunfeld et al., 1981). В то же время при встраивании солюбилизованных эритроцитов индюка в искусственные фосфолипидные везикулы, различающиеся примерно вдвое по степени насыщенности жирных кислот, наоборот, в условиях более насыщенного липидного окружения аффинность рецепторов повышалась, а их число уменьшалось (Gould et al., 1982).

Сделанный обзор дает основание говорить о том, что точный механизм, посредством которого липиды мембраны влияют на связывание инсулина его рецепторами, неизвестен. Простые корреляции между уровнем связывания гормона и средней вязкостью мембраны мало что разъясняют в существе липид-рецепторных взаимодействий. По-видимому, как и в других случаях, эти взаимодействия определяются состоянием пограничных липидов, составляющих непосредственное окружение рецептора. В этом направлении нужны дальнейшие исследования.

Специально следует подчеркнуть, что изменения в липидном матриксе влияют не только на доступность рецепторов для инсулина (т. е. на число рецепторов), но и на их аффинность. Если изменение числа рецепторов при модификации липидов так или иначе связано с их перемещением в бислое, то изменение аффинности есть результат более тонких липид-рецепторных взаимодействий. Возможно, что изменение липидов в микроокружении рецептора влияет на его конформацию или доступность для регуляторных белков.

При всей неполноте наших знаний о микроокружении инсулинового рецептора в мембране клетки они все же достаточно ясно говорят о том, что „вмонтированный“ в мембрану рецептор оказывается включенным в сложную систему взаимодействий, во многом определяющих его функциональное состояние. Мы еще раз хотим обратить внимание на влияние мембранных факторов (как белков, так и липидов) именно на аффинность рецептора. Вероятно, изменения аффинности часто опосредованы изменениями в микроокружении рецептора. Можно думать, что так обстоит дело, например, при голодании и вообще при состояниях, ведущих к изменению клеточного метаболизма. Изменение реакции рецепторов на голодание при денервации печени (Бездробный, Евдокимова, 1984) может иметь в основе этот же механизм. Важно и то, что изменение аффинности — это фактор быстрой регуляции. Как отмечает Муггео и др. (Muggeo et al., 1977), для изменения аффинности инсулинового рецептора требуются минуты или часы, тогда как для изменения концентрации рецепторов — дни. По-видимому, быстрые изменения аффинности возможны именно благодаря существованию подвижного равновесия между рецептором и его ближайшим мембранным окружением.

Латеральная диффузия рецепторов. Роль рецепторов в интернализации инсулина. С еще одним аспектом инсулин-рецепторных взаимодействий мы сталкиваемся, рассматривая рецептор в контексте общей организации мембраны как жидко-мозаичной структуры. В поле нашего зрения попадают такие феномены, как латеральная диффузия рецепторов, способность их к агрегированию и интернализации. Рецептор в этом своем качестве выступает как фактор, определяющий судьбу связанного инсулина. Остановимся на этом более подробно.

Транслокация макромолекул с клеточной поверхности внутрь клетки — важный и широко распространенный биологический феномен. Принято различать: фагоцитоз, когда речь идет о поглощении клеткой частичек; жидкофазный пиноцитоз — неселективный процесс, определяемый только концентрацией вещества в клеточном окружении; наконец, адсорбтивный эндоцитоз, лежащий в основе интернализации пептидов, имеющих рецепторы на поверхности клетки (обзор: Steinman et al., 1983). Целый ряд биохимических и морфологических данных указывает на то, что связанный с рецептором инсулин также подвергается интернализации (обзоры: Gorden et al., 1980, 1982; King, Cuatrecasas, 1981; Pastan, Willingham, 1981; Кусень, 1982).

Последовательность событий от момента связывания инсулина рецептором и до собственно интернализации хорошо изучена. Диффузно распределенные по клеточной поверхности рецепторы после связывания гормона обретают способность к движениям в латеральной плоскости. Двигаясь по направлению друг к другу, они в виде глыбок (кластеров) скапливаются в так называемых покрытых ямках — местах, где происходит собственно эндоцитоз. Покрытые ямки — это углубления в клеточной стенке, выстланные с внутренней поверхности клетки слоем щетинкоподобного белка клатрина, выполняющего роль своеобразного каркаса (так называемая клатриновая корзинка). Покрытые ямки являются универсальным компонентом клеточных мембран, они встречаются в клетках всех типов; в фибробластах на их долю приходится около 2 % клеточной поверхности. Функция покрытых ямок состоит в обеспечении эндоцитоза любых макромолекул.

Латеральная диффузия оккупированных рецепторов осуществляется без затрат метаболической энергии, но зависит от температуры. В фибробластах при 4 °С гормон-рецепторные комплексы неподвижны, но уже при 23 °С скорость латеральной диффузии достаточна, чтобы обеспечить каждому комплексу встречу с ближайшей «покрытой ямкой» в течение 4—5 с, а при 37 °С процесс заканчивается образованием неподвижных глыбок (Schlessinger, 1980). В лимфоцитах IM-9 движение связанного рецепторами инсулина упорядочено и собственно связывание происходит на микровиллах, откуда гормон перемещается к гладким, более глубоко расположенным компартментам клеточной поверхности (Carpentier et al., 1981a). На микровиллах концентрация рецепторов выше и они более доступны; с другой стороны, покрытые ямки в этих клетках локализуются в гладких доменах мембраны. Такая упорядоченность перемещений свойственна и другим ворсинчатым клеткам, например гепатоцитам (Gorden et al., 1982). В лимфоцитах цикл заканчивается перераспределением гормон-рецепторных комплексов в направлении полюса Гольджи, где оккупированные рецепторы в конечном счете образуют «шапочку» — так называемый кешпинг рецепторов (Bagazzone et al., 1980; Schlessinger et al., 1980). Полагают, что за всеми этими феноменами стоит механизм сегрегации, посредством

которого клетка распределяет макромолекулы по местам, наиболее подходящим для интернализации.

Существенно, что судить о перемещениях гормон-рецепторных комплексов по поверхности клетки можно не только по движениям меченной тем или иным способом молекулы инсулина, но и по движениям самих рецепторов, если они связаны с антирецепторными антителами (Carpentier et al., 1981b). Последовательность событий (включая и такие, как «кеппинг») здесь совершенно одинакова, что определенно позволяет говорить о том, что инсулин способен к латеральным движениям, только будучи связанным с рецепторами.

Инициатором латеральной диффузии рецепторов является инсулин, однако механизм, посредством которого он это делает, точно не известен. Широко обсуждалась возможность того, что движение и агрегация гормон-рецепторных комплексов есть результат самоагрегации молекулы инсулина на поверхности клеток, однако вероятность этого мала, так как при физиологических концентрациях (10^{-11} — 10^{-9} М) инсулин является мономером, димеры же образуются при концентрации гормона не ниже 10^{-7} М. Более вероятно, что механизм агрегации является мембранным механизмом. Например, можно было бы допустить, что изменение конформации рецепторов, вызванное связыванием инсулина, повышает их сродство к белкам цитоскелета, в частности к белкам покрытых ямок. Это объяснило бы направленность движения гормон-рецепторных комплексов. Не исключено также, что комплексы агрегируют вследствие активации в мембране каких-то кросс-сшивающих факторов, например ферментов типа мембранной трансглутаминазы.

Нагруженные глыбками агрегированных гормон-рецепторных комплексов, покрытые ямки углубляются, замыкаются и отрываются от мембраны, превращаясь в плавающие внутри клетки везикулы. Такова феноменология собственно эндоцитоза. Дальнейшее состоит в перемещении везикул по направлению к центру клетки, при этом они теряют клатриновую оболочку и, сливаясь друг с другом, превращаются в более крупные «гладкие везикулы», иногда называемые рецептосомами (Pastan, Willingham, 1981). С функциональной точки зрения везикулы — это своего рода контейнеры: они уносят с мембраны содержимое покрытых ямок, доставляют его к местам внутриклеточного процессинга, после чего возвращают обратно, снова встраиваясь в мембрану. Местами внутриклеточного процессинга инсулина являются лизосомы и/или аппарат Гольджи или же структуры, по своей электронной плотности промежуточные между аппаратом Гольджи и лизосомами. Факторами, определяющими скорость интернализации, являются, во-первых, сам инсулин, а во-вторых, температура, повышение которой в пределах от 20 до 37 °С ускоряет процесс, а снижение до 20 °С и ниже полностью его останавливает. Время, необходимое для интернализации инсулина при 37 °С, составляет не более 30 мин. Интернализация в отличие от латеральной диф-

фузии сопряжена с затратами метаболической энергии и ингибируется циклогексепидом.

Террис и Стейнер (Terris, Steiner, 1975) первыми показали, что деградация инсулина опосредована его связыванием с рецепторами и предполагает поступление гормона в клетку. В настоящее время внутриклеточная деградация инсулина признается всеми. Не вдаваясь в детали, отметим, что в конечном счете она приводит к накоплению в лизосомах и к последующему выведению из клетки низкомолекулярных продуктов, лишенных биологической активности (Olefsky et al., 1982).

Какова же роль рецепторов в интернализации гормона? Прежде всего приведем доказательства того, что при действии инсулина на клетку рецепторы интернализуются. 1. Рецепторы обнаруживаются в тех же покрытых клатрином везикулах, что и сам интернализированный инсулин. Это показано по способности солиобилизованных везикул связывать инсулин- ^{125}I , добавляемый *in vitro* или введенный в портальную вену крысы, так и по выявлению в них субъединиц рецептора после ковалентного связывания им меченого гормона (Pilch et al., 1983). 2. Меченные инсулином- ^{125}I с помощью фотоаффинного аналога субъединицы рецептора в гепатоцитах крысы интернализировались при повышении температуры инкубации клеток с 15 до 37 °С. Об этом можно было судить по утере в процессе инкубации способности трипсина протеолитически расщеплять субъединицы на фрагменты и по исчезновению из мембраны следов субъединиц при автордиографии (Fehlmann et al., 1983). В подобных же опытах на адипоцитах крысы показано, что транслокация субъединицы рецептора в клетку пропорциональна концентрации инсулина. В этих опытах интернализированный рецептор обнаруживался в микросомальной фракции, обогащенной элементами аппарата Гольджи (Wang et al., 1983). 3. В пользу интернализации рецепторов говорит также интернализация связанных с ними антирецепторных антител, показанная на лимфоцитах IM-9. При этом интернализуются не только связанные с рецепторами полные двухвалентные антитела (Carpentier et al., 1981b), но и биологически неактивные одновалентные их Fab'-фрагменты (Kasuga et al., 1983a). Скорость интернализации антирецепторных антител зависит от тех же факторов, что и скорость интернализации самого инсулина.

Наличие прямых доказательств интернализации рецепторов является веским доводом в пользу того, что инсулин проникает в клетку только будучи связанным с ними. Как и в событиях, предшествующих интернализации (латеральная подвижность, агрегация), образование гормон-рецепторных комплексов является условием вовлечения лиганда в процесс, т. е. интернализация инсулина опосредована интернализацией рецепторов.

Однако по завершении интернализации пути инсулина и рецептора расходятся. Если судьбой интернализованного инсулина является деградация и удаление из клетки, то для рецептора инсулина существует возможность вновь встроиться в клеточную мембрану. Рециклизация инсулинового рецептора, предполагавав-

шаяся по аналогии с рецепторами других гормонов, теперь подтверждена прямыми наблюдениями. В гепатоцитах крысы рециклирование предварительно интернализированных меченых субъединиц рецептора достигалось простым удлинением времени инкубации при 37 °С до 1—5 ч. За это время имело место восстановление утраченной после интернализации рецептора чувствительности клетки к трипсину (при обработке ферментом вновь обнаруживались фрагменты разрушенных субъединиц) и наблюдалось перемещение из центра клетки в мембрану автордиографических гранул (Fehlmann et al., 1982). Кроме относительно медленной скорости, рециклизацию в этих опытах отличала избирательность в том смысле, что она была доступна для интактных рецепторов, но не для рецепторов с хотя бы минимально фрагментированными субъединицами. Деликатность механизмов, лежащих в основе рециклизации рецепторов, видна и из того, что процесс *in vitro* идет лишь при инкубации клеток в более физиологичном буфере на основе Гепеса, но не в простом Трис-буфере (Olefsky et al., 1982). Детали процесса диссоциации гормона и рецептора точно неизвестны, но несомненно, что для обратного перемещения в мембрану рецептор использует тот же челночный механизм, который уже служил для его доставки внутрь клетки (Smith, Jarett, 1983).

Итак, перемещаясь по клетке, рецептор совершает своего рода круговорот. Вначале он мигрирует по клеточной поверхности, далее следует его транслокация внутрь клетки и, наконец, — возвращение в исходную позицию. Импульсом для начала цикла является связывание рецептором инсулина, и наиболее очевидным последствием круговорота является очистка клеточной поверхности от рецепторов, оккупированных гормоном, и замена их свободными. Так как интернализированный инсулин в клетке деградирует и продукты деградации выводятся, можно считать, что эндоцитоз рецепторов обеспечивает отключение гормонального сигнала.

Обсуждалась и другая возможность. Предполагалось, что инсулин действует внутриклеточно и что, следовательно, интернализация необходима для активации им клеточного метаболизма. В настоящее время эта точка зрения встречает серьезные возражения. Показано, что ингибиторы интернализации не ослабляют метаболических эффектов инсулина (Le Cam et al., 1979), а ингибитор лизосомальной деградации хлороквин, хотя и способствует накоплению инсулина в клетке, не усиливает эффектов гормона (Olefsky et al., 1982). Кроме того, ряд гормонов, хотя и интернализуется, но действует заведомо через аденилатциклазную систему, локализованную в плазматической мембране. Наконец, факт интернализации не только биологически активных полных антител к рецептору, но и их неактивных (в смысле инсулиноподобного действия) одновалентных Fab'-фрагментов говорит о том, что и в случае антител интернализация не является критической стадией в активации клеточного метаболизма.

При всей убедительности этих аргументов, полностью снять вопрос о внутриклеточном действии инсулина все же нельзя, принимая во внимание наличие инсулиновых рецепторов внутри клетки, и в первую очередь в ее ядерной оболочке (Goldfine, 1981). Извлеченные из клетки в составе ядерной оболочки, эти рецепторы специфически связывают инсулин-¹²⁵I, однако играют ли они какую-либо роль при действии инсулина на целую клетку, остается неясным. Имеются данные, что при голодании, аллоксановом диабете и экспериментальной гиперинсулинемии они количественно меняются в том же направлении, что и рецепторы плазматических мембран (Бездробный, 1984). Показано также, что инсулин, добавленный к изолированным клеточным ядрам, вызывает дефосфорилирование фермента ядерной оболочки нуклеозидтрифосфатазы (Puggello et al., 1983a, 1983b). Вероятно, что этот эффект гормона, свидетельствующий о его возможности влиять на метаболизм мРНК, реализуется через указанные рецепторы. Тем не менее доступность для ядерных рецепторов инсулина, проникшего в клетку с использованием механизма эндоцитоза, еще требует доказательств.

Альтернативная рассмотренной точка зрения на механизм действия инсулина состоит в том, что осуществление эффектов гормона опосредуется через активацию им каких-то мембранных механизмов. Сегодня эта точка зрения опирается на такой факт, как стимуляция инсулином протеинкиназной активности β -субъединицы его собственного рецептора со всеми вытекающими из этого последствиями, а также на данные о том, что инсулин способен генерировать в мембране клетки образование низкомолекулярных пептидов — вторых мессенжеров гормона (Larner et al., 1982; Seals, Czech, 1982; Jarrett et al., 1982). Достаточно ли этих механизмов, чтобы обусловить все многообразие эффектов инсулина на метаболизм клеток-мишеней, покажут будущие исследования.

РЕЦЕПТОР КАК ЭЛЕМЕНТ ИНСУЛИНОВОГО РЕГУЛЯТОРНОГО МЕХАНИЗМА

Основной вопрос физиологии гормональных рецепторов — это вопрос о том, как соотносятся друг с другом рецепторы и клеточный ответ на гормон. В случае инсулина, как и в случае других пептидных гормонов, наиболее приемлемый ответ на него дает теория оккупации Кларка, основной постулат которой гласит, что биологический ответ на лиганд пропорционален числу оккупированных рецепторов (Voeuhtems, Dumont, 1980). Пропорциональность между связыванием инсулина и его эффектами действительно существует, однако картину усложняет (и в этом отношении инсулин не отличается от многих других лигандов) наличие в клетках-мишенях «запасных» рецепторов. Так, например, в жировых клетках крысы гормону, чтобы вызвать максимальный эффект, достаточно оккупировать порядка 10 % рецепторов (Gammeltoft, Gliemann, 1973). «Запасные» рецепторы ничем не отличаются

от «работающих», и выбор гормоном того или другого рецептора, по всей видимости, случаен. Олефски и Колтерман (Olefsky, Colterman, 1981) проанализировали, как избыток рецепторов отражается на ситуации в клетке. Реакция клетки на увеличение концентрации инсулина представляет собой непрерывное возрастание оккупации рецепторов и биологического ответа до тех пор, пока число оккупированных рецепторов не станет достаточным, чтобы ответ стал максимальным. При дальнейшем увеличении концентрации инсулина оккупация рецепторов будет возрастать и далее, но ей не будет сопутствовать повышение ответа, так как теперь его лимитируют не рецепторы, а какие-то факторы позади них. Если теперь концентрация инсулина начнет снижаться, то на величине биологического ответа это скажется не сразу, а лишь когда число рецепторов упадет ниже уровня, при котором ответ выходит на плато. Благодаря резерву рецепторов система работает мягко и как бы имеет запас прочности на случай снижения концентрации гормона. Что же касается возможного снижения числа рецепторов в клетке, то оно также довольно долго может не приводить к снижению биологического эффекта. Только когда число рецепторов снижается до такой степени, что их полная оккупация недостаточна, чтобы вызвать максимальный ответ клетки, они становятся фактором, определяющим ход концентрационной кривой доза-ответ.

Теория оккупации предусматривает, что при неизменяющемся уровне концентрации лиганда ответ на него со стороны клетки будет определяться количеством доступных рецепторов и их аффинностью. Имеется большая литература, свидетельствующая о том, что в случае рецепторов инсулина оба эти показателя способны изменяться.

О механизмах изменения аффинности рецепторов уже упоминалось. Ясно, что ближайшим таким механизмом является функциональная подвижность связывающего домена рецепторной молекулы. Мы уже говорили о способности α -субъединицы рецептора изменять свою конформацию, о ее чувствительности к внешним воздействиям. К этому следует добавить, что β -субъединица, как кажется, не способна подвергаться метаболической активации (автофосфорилироваться), если импульсы для этого не исходят от α -субъединицы. В этом смысле автофосфорилирование рецептора рассматривается как сугубо внутримолекулярный процесс (Shia et al., 1983). Если так, то связывающая субъединица является единственным входом для сигналов извне и только к ней могут быть приложены регуляторные воздействия.

Изменения связывающих характеристик α -субъединицы могут быть следствием структурных перестроек в рецепторе. Об этом можно думать на том основании, что связывающие характеристики рецептора (аффинность) можно изменить, воздействуя на рецептор лектинами, т. е. модулируя углеводный компонент рецепторной молекулы (Cuatrecasas, Tell, 1973; Caron et al., 1983). Повышение аффинности наблюдалось также при взаимодействии связанного с рецепторами плазматической мембраны печени крысы инсулина

с антиинсулиновой сывороткой. Вероятно, утяжеление лиганда за счет присоединения к нему молекулы антитела вызывает более основательные изменения конформации рецептора, что отражается на его функциональных характеристиках (Лейбуш, Бондарева, 1982). Однако более важной предпосылкой для изменения аффинности, как уже указывалось, является наличие подвижного равновесия между рецептором и его ближайшим мембранным окружением. Изменение аффинности в первую очередь должны вызвать факторы, способные влиять на пептиды, с которыми рецептор взаимодействует в мембране, и на липиды мембранного матрикса. При этом следует учесть, что мембранное окружение рецептора неодинаково, поэтому одни и те же воздействия в разных тканях-мишенях могут вызвать со стороны рецепторов разный ответ (Pottik et al., 1981).

О регуляции инсулином числа рецепторов в клетках-мишенях. Более фундаментальным по сравнению с изменениями аффинности регуляторным механизмом, которым располагает клетка, для того чтобы модулировать свой ответ на гормон, является изменение числа рецепторов на ее поверхности. Количество рецепторов может изменяться по разным причинам, но важнейшей из них является изменение концентрации гормона в клеточном окружении. Инсулин индуцирует понижение числа рецепторов (так называемая даун-регуляция), его удаление возвращает их число к исходному. В основе феномена, как будет показано, лежит эндоцитоз рецепторов.

С точки зрения того, что происходит с рецепторами клетки при действии инсулина, следует различать случаи кратковременного и длительного контакта клеток с гормоном. Кратковременный контакт, вызванный, например, единичной инъекцией инсулина, не приводит к снижению количества рецепторов в расчете на клетку, но судя по тому, что было показано на гепатоцитах крысы, вызывает их перераспределение, в результате которого на какое-то время количество рецепторов уменьшается на поверхности и увеличивается внутри клетки (Desbuquos et al., 1982). Транслокация рецепторов в этом случае обратима.

При длительном контакте клеток с инсулином в условиях *in vitro* перераспределением рецепторов дело не ограничивается. На культуре лимфоцитов IM-9 человека было впервые показано, что в этом случае имеется истинное (т. е. в расчете на клетку) уменьшение числа рецепторов, пропорциональное времени контакта клеток с гормоном (Gavin et al., 1974; Kosmacos, Roth, 1980). Рецепторы снижаются до нового равновесного состояния, уровень и быстрота достижения которого находятся в прямой зависимости от концентрации инсулина и температуры. При температуре ниже чем 20° С инкубация клеток с инсулином не приводит к уменьшению числа рецепторов. Снижения числа рецепторов не наблюдается и в том случае, если инкубация с гормоном проводится в присутствии ингибитора белкового синтеза циклогексемида. После отмывания клеток от инсулина количество рецепторов в них

постепенно возвращается к первоначальному с полупериодом, равным 8—10 ч.

Сходную картину вызывает продолжительный контакт с инсулином изолированных адипоцитов крысы, фибробластов, выращенных в культуре клеток печени и некоторых других типов клеток (см.: Olefsky et al., 1982). С экспериментами *in vitro* коррелируют наблюдения о наличии обратной связи между уровнем инсулина в крови и числом рецепторов в инсулинзависимых тканях человека и животных. В совокупности все эти данные позволяют говорить о регуляции инсулином числа своих рецепторов, как о важном биологическом феномене, что делает понятным интерес исследователей к механизмам, лежащим в его основе.

Все говорит о том, что инсулин вызывает убыль рецепторов с поверхности клетки путем стимуляции их эндоцитоза. Условия, необходимые, чтобы вызвать эндоцитоз рецепторов и их убыль, одни и те же: оба процесса одинаково стимулируются инсулином и зависят от времени экспозиции с ним клеток; для обоих ингибиторами являются температура ниже 20° С и циклогексимид. Олефски с соавт. (Olefsky et al., 1982) сравнили быстроту убыли рецепторов с поверхности адипоцитов и быстроту накопления в клетках гормон-рецепторных комплексов и нашли, что оба процесса хорошо коррелировали друг с другом. Наконец, как уже говорилось, способность инсулина вызывать транслокацию рецепторов прямо была показана при работе с мечеными рецепторами.

Механизмом эндоцитоза можно объяснить убыль рецепторов с поверхности клетки, но встает вопрос, каким образом инсулин вызывает последующее уменьшение числа рецепторов внутри клетки — индуцирует ли инсулин торможение синтеза рецепторов или повышение их деградации (инактивации)? Ответ на этот вопрос был получен при исследовании как того, так и другого процессов. Скорость синтеза была измерена методом так называемого тяжелоизотопного сдвига плотности рецепторов (Reed, Lane, 1980). В клеточную культуру вводят аминокислоты, обогащенные тяжелыми изотопами углерода, азота и водорода. Включение этих аминокислот в рецептор повышает плотность вновь синтезированных рецепторов. «Новые тяжелые» и «старые легкие» рецепторы можно разделить и измерить их относительное количество. Определенное этим методом время полужизни рецепторов инсулина в адипоцитах линии 3Т3-L1 оказалось равным 8.1—8.6 ч. В этих же клетках скорость синтеза рецепторов была исследована в условиях длительного контакта с инсулином, после отмывания гормона от клеток и при повторном контакте с ним. Инсулин как при первом, так и при повторном контакте с клетками вызывал в них уменьшение количества рецепторов вдвое против исходного; отмывание восстанавливало их количество до исходного уровня за период полувремени 2—3 ч. Во всех случаях скорость синтеза «новых тяжелых» рецепторов не изменялась, но убыль «старых легких» рецепторов значительно варьировала и была сильнее при контакте с гормоном и слабее при его удалении.

Благодаря этому в последнем случае время полужизни рецепторов увеличивалось до 14,8 ч. Опыты показали, что в условиях «даун-регуляции» инсулин влияет на деградацию рецепторов, но не на их синтез (Ronnet et al., 1982).

Прямое определение скорости деградации рецепторов при даун-регуляции было проведено на культуре человеческих лимфоцитов IM-9 (Kasuga et al., 1981). Рецепторы помечивали биосинтетически с помощью ^{35}S -метионина или поверхностной меткой с помощью ^{125}I и после солюбилизации осаждали антирецепторными антителами. О деградации рецепторов судили по уменьшению радиоактивности, ассоциированной с субъединицами рецептора. Время полужизни рецептора, определенное по распаду субъединиц, составляло 9—12 ч. Инкубация клеток с инсулином усиливала деградацию, что приводило к сокращению этого времени в 2,5—3 раза. Скорость деградации была пропорциональна концентрации инсулина и блокировалась циклогексепидом, точкой приложения которого, как выясняется из данной работы, являются ферменты, разрушающие гормон. Расчетная скорость синтеза рецепторов в условиях контакта с гормоном не изменялась.

Представляет интерес динамика перехода рецепторов к новому равновесию при контакте с инсулином. При исследовании этого вопроса методом «сдвига плотности рецепторов» на фибробластах 3T3-C2 линии (Knutson et al., 1983) обнаружилось, что вначале инсулин вызывает быструю ($t \geq 10$ мин) и обратимую транслокацию поверхностных рецепторов во внутриклеточный компартмент, и только если контакт с инсулином продолжается, включается механизм деградации. Деградация двухфазна — вначале она идет быстро, затем ослабевает, и в общем новое равновесие устанавливается довольно медленно (период полувремени 3—4 ч). В конечном счете скорость распада всех клеточных рецепторов определяется той их частью, которая находится внутри клетки. Эту часть определяет инсулин, поскольку он инициирует переход рецепторов в клетку и их рециклирование.

Рециклированию рецепторов в механизме даун-регуляции принадлежит немаловажная роль. Олефски и соавторы обратили внимание на то, что скорость индуцируемого инсулином снижения числа рецепторов значительно ниже *in vitro*, чем *in vivo*. Авторы предположили, что *in vivo* инсулин проявляет те же эффекты, однако в физиологических условиях они нивелируются активным процессом рециклирования. И действительно, инкубация изолированных гепатоцитов с инсулином в Трис-буфере приводила к четкому снижению числа рецепторов, а в более физиологичном буфере на основе Гепеса такого эффекта не наблюдалось. Трис рассматривается исследователями как ингибитор рециклирования (Olefsky et al., 1982). По Фелману (Fehlmann et al., 1982), инсулин стимулирует деградацию рецепторов, но одновременно тормозит их рециклирование. Влияние гормона на каждый из этих процессов варьирует в зависимости от конкретных условий, и в конечном счете судьбу интернализированных рецепторов определяет тот про-

цесс, который более чувствителен к гормону. В случае, когда рецепторы, ускользнувшие от деградации, не задерживаются во внутреннем компартменте, а имеют возможность встроиться в мембрану, феномен даун-регуляции проявляться не может. Понятно, что это должно быть принято в расчет при анализе физиологического и клинического материала.

Описанный механизм, вероятно, не является универсальным. Например, в культуре клеток печени кур инсулин даже в условиях длительного контакта с клетками вызывает лишь перераспределение рецепторов без изменения их концентрации в расчете на клетку (Kurr, Lane, 1982). В некоторых случаях, в частности в культуре лимфоцитов М-9, своего рода эквивалентом даун-регуляции может быть сращивание («шеддинг») рецепторов с поверхности клетки. В этом случае рецепторы деградируют в окружающей клетку среде (Berhanu, Olefsky, 1983).

Представлены доказательства того, что свойством снижать число инсулиновых рецепторов в клетках обладает не только инсулин, но и моноклональные антитела к его рецепторам, при этом по сравнению с инсулином их эффект был в 100 раз более сильным (R. Roth et al., 1983a). Моноклональные антитела, как известно, не обладают инсулиноподобной активностью и как будто бы не стимулируют протеинкиназную активность β -субъединицы (Roth, Cassell, 1983). Из совокупности этих данных делается вывод о том, что механизм даун-регуляции и механизм стимуляции инсулином клеточного ответа различны. Это не удивляет, если мы исходим из того, что в основе первого из них лежит интернализация гормон-рецепторных комплексов, а второй как-то связан с метаболической активацией рецептора. Полученные данные можно рассматривать как еще один довод в пользу независимости трансмембранной передачи гормонального сигнала от интернализации инсулина.

В заключение следует отметить, что к числу биологически значимых регуляторов числа инсулиновых рецепторов и их свойств, помимо уровня инсулина в крови, следует отнести также уровень в крови других гормонов, изменение рН крови (ацидоз), физические упражнения, характер питания (количество и состав пищи), клеточную программу (тип клеток, дифференциация, рост, клеточная трансформация) и многие другие, менее изученные факторы.

РЕЦЕПТОР ИНСУЛИНА С ЭВОЛЮЦИОННОЙ ТОЧКИ ЗРЕНИЯ

Представление о рецепторе инсулина будет неполным без учета его эволюционного прошлого. Ограничимся кратким обсуждением этого вопроса.

Инсулин относится к числу древних гормонов (Лейбсон, 1983), и это предполагает такую же древность его рецепторов. Сейчас мы располагаем данными, характеризующими рецептор только у позвоночных, из которых следует, что уже наиболее примитивные из позвоночных — круглоротые — имеют рецептор инсулина,

в функциональном отношении не отличающийся от рецептора у млекопитающих. В частности, как для того, так и для другого рецептора характерна одинаково высокая селективность, причем оба рецептора предпочитают инсулины, более биологически активные, а не более близкие в видовом отношении. Сопоставление инсулинового ряда и ряда рецепторов по функциональной изменчивости в эволюции показывает, что за последние 400—500 млн. лет рецепторы изменились меньше, чем сам гормон. Таким образом, инсулиновый рецептор позвоночных может быть охарактеризован как структура, в функциональном отношении высоко консервативная (Muggeo et al., 1979a, 1979c; Лейбуш, Бондарева, 1981; Лейбуш, 1983).

Нам ничего не известно об инсулиновых рецепторах беспозвоночных, но можно подозревать, что и здесь инсулин распознается молекулой, очень близкой к рассмотренной выше. Оснований для такого заключения два: во-первых, высокая консервативность рецептора в том, что касается связывания инсулина и, во-вторых, консервативность функции самого инсулина. Этот гормон на всем протяжении эволюции выполняет одну и ту же роль, способствуя поступлению в клетку питательных веществ и отложению их в виде резервов. Логично думать, что одни и те же функции опосредует один и тот же рецептор. Остается лишь подчеркнуть, что речь в данном случае идет о функциональной стороне дела, и, следовательно, все сказанное относится к связывающему (распознающему) локусу рецепторной молекулы.

Представляет интерес вопрос о том, как далеко вглубь уходит история рецептора инсулина. В свете находок инсулина у одноклеточных (что, однако, нуждается в более строгих доказательствах) кажется, что инсулиновый рецептор появляется тогда же, когда появляется сама клеточная мембрана (J. Roth et al., 1982). Прямых доказательств этому нет, имеются лишь сведения о возможности получить некоторые эффекты инсулина при действии его на простейших (Csaba, 1980), но реализуются ли они через специфичный рецептор, не установлено. Все же интересно, что некоторые другие гормональные рецепторы, найденные у одноклеточных, по своим свойствам похожи на рецепторы высших животных (Feldman et al., 1982; Weiss et al., 1983).

Что касается позвоночных, то здесь следует остановиться еще на одном обстоятельстве. Некоторые данные (наша совместная работа с В. М. Бондаревой) говорят о том, что у низших позвоночных (круглоротые) уровень инсулина в крови и количество рецепторов в клетках-мишенях не связаны друг с другом реципрокными отношениями. Это дает основание полагать, что механизм обратной связи в системе инсулин-рецепторы у этой группы еще отсутствует. Однако, является ли появление такого механизма более поздним эволюционным приобретением и можно ли говорить в данном случае о вовлечении эволюционно древней структуры в более совершенную систему взаимосвязей, судить пока трудно. Все эти вопросы являются задачей будущих исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рецептор инсулина, появившийся, как и сам инсулин, на ранних этапах эволюции, вероятно, уже у одноклеточных, и в дальнейшем отличавшийся высокой функциональной консервативностью, у высших животных представлен молекулой, построенной как гетеротетрамер, включающий две пары субъединиц, прошитых дисульфидными связями. По своей природе рецептор является гликопротеином с молекулярной массой порядка 350 кД. Кроме этой молекулы, в интактной мембране встречаются структуры с молекулярной массой 320 и 280 кД, являющиеся производными молекулы рецептора, в которых одна из субъединиц представлена своим редуцированным фрагментом. Все три молекулы способны связывать инсулин, не отличаясь в этом отношении друг от друга. Минимальной структурой, еще способной связывать инсулин и трансформировать гормональный сигнал в клеточный ответ, является димер рецептора, состоящий из α (молекулярная масса 130 кД) и β (молекулярная масса 95 кД) субъединиц. Димер синтезируется как одна полипептидная цепь, содержащая большое количество маннозных остатков. На пути от рибосом к мембране пептид подвергается углеводному процессингу и путем протеолиза разделяется на субъединицы. Время полужизни рецептора в мембране оценивается в 7—9 ч.

Связывание рецептором инсулина является неклассическим, что находит отражение в криволинейной зависимости Скэтчарда. Наличие вогнутости на графике Скэтчарда объясняют либо феноменом отрицательной кооперативности, либо гетерогенностью популяции рецепторов, из которых одни имеют высокое, а другие низкое сродство к лиганду. Пока не представлено доказательств, позволяющих безоговорочно принять то или иное объяснение, поэтому правомерно относиться к предлагаемым моделям лишь как к способам формального описания экспериментальных данных.

Инсулин связывается α -субъединицей рецептора. Ближайшим следствием этого является изменение ее конформации, что в свою очередь вызывает фосфорилирование β -субъединицы. Последняя является протеинкиназой и одновременно субстратом фосфорилирования. С функциональной точки зрения рецептор может быть определен как инсулинзависимая тирозинспецифичная протеинкиназа. Вероятно, стимулируемое инсулином автофосфорилирование рецептора существенно для трансмембранной передачи гормонального сигнала и для инициации ответа клетки на гормон.

В жидко-кристаллической мембране клетки рецептор испытывает воздействие со стороны липидного матрикса и белков, составляющих микроокружение рецептора. Результатом этих воздействий может быть изменение способности рецептора связывать инсулин. Другим следствием пребывания рецептора в полужидкой среде является его подвижность. Подвижность инициируется инсулином и в конечном счете приводит к интернализации последнего. Интернализация инсулина целиком обусловлена интерна-

лизацией рецепторов. Ее следствием является внутриклеточная деградация гормона с последующим выводом продуктов деградации из клетки. Имеются веские основания полагать, что большинство (если не все) эффектов инсулина опосредовано рецепторами клеточной мембраны и не требует его проникновения в клетку.

Интернализированные рецепторы инсулина после освобождения от лиганда могут рециклировать, снова встраиваясь в мембрану клетки. Круговорот рецепторов обеспечивает освобождение клеточной поверхности от гормона и тем самым приводит к отключению гормонального сигнала.

Сродство рецепторов к инсулину и количество рецепторов на поверхности клетки могут изменяться, тем самым осуществляется модуляция гормонального сигнала на рецепторном уровне. К изменению аффинности рецептора могут приводить внутримолекулярные перестройки или же (что более часто) изменение соотношения между рецептором и его микроокружением в мембране. К изменению числа рецепторов в первую очередь приводит изменение уровня инсулина в клеточном окружении. Важнейшим механизмом является «даун-регуляция» — снижение числа рецепторов в ответ на повышение уровня инсулина. В основе ее лежит стимуляция инсулином эндоцитоза рецепторов и их последующей деградации. Выраженность феномена зависит не только от скорости деградации интернализированных рецепторов, но и от интенсивности их рециклирования, т. е. определяется всей совокупностью факторов, от которых зависит круговорот рецепторов в клетке.

Кроме уровня инсулина в крови, на связывание рецепторами инсулина влияет много других факторов. Многообразие этих факторов, равно как сложность структурной и функциональной организации рецептора, делают возможным участие рецепторного звена в нарушении инсулиновой регуляции, а в некоторых случаях патология рецепторов может оказаться первопричиной заболевания.

Л и т е р а т у р а

- Бездробный Ю. В. Свойства и организация инсулиновых рецепторов периферических тканей. — Усп. совр. биол., 1980, т. 90, № 1 (4), с. 80—96.
- Бездробный Ю. В. Регуляция экспрессии инсулиновых рецепторов и их место в механизме действия инсулина. — Усп. совр. биол., 1981, т. 92, № 1 (4), с. 35—48.
- Бездробный Ю. В. Специфическое связывание ^{125}I -инсулина плазматическими мембранами и оболочками ядер гепатоцитов при экспериментальной гиперинсулинемии, аллоксановом диабете и голодании. — Цитология, 1984, т. 26, с. 818—825.
- Бездробный Ю. В., Евдокимова Н. Ю. Орнитид, но не атропин, снимает реакцию инсулиновых рецепторов жировых и печеночных плазматических мембран на голодание и гиперинсулинемию. — Физиол. журн. СССР, 1984, т. 70, с. 200—205.
- Кендыш И. Н. Молекулярные аспекты механизма действия инсулина. — Усп. совр. биол., 1983, т. 96, № 2 (5), с. 238—254.

- Кусень С. И. Интернализация и внутриклеточные превращения биологически активных полипептидов и их рецепторов. — Усп. совр. биол., 1982, т. 94, № 3 (6), с. 376—392.
- Лейбсон Л. Г. Происхождение и эволюция эндокринной системы. — В кн.: Эволюционная физиология. Ч. 2. Л.: Наука, 1983, с. 3—52. (Руководство по физиологии).
- Лейбуш Б. Н. Инсулиновые рецепторы головного мозга в эволюции позвоночных. — Журн. эвол. биох. физиол., 1983, т. 19, с. 407—413.
- Лейбуш Б. Н., Бондарева В. М. Инсулиновый рецептор плазматических мембран клеток печени морского ерша *Scograea rogersi* в сравнении с рецептором млекопитающих. — Журн. эвол. биох. физиол., 1981, т. 17, с. 141—147.
- Лейбуш Б. Н., Бондарева В. М. Анализ инсулин-рецепторных взаимодействий в плазматической мембране печени крыс с использованием антител к инсулину. — Биохимия, 1982, т. 47, с. 1687—1694.
- Лейбуш Б. Н., Колычев А. П., Бондарева В. М. Инсулиновые рецепторы эритроцитов в онтогенезе кур. — Онтогенез, 1984, т. 15, с. 290—296.
- Amatruda J. M., Finch E. D. Modulation of hexose uptake and insulin action by cell membrane fluidity: the effects of temperature on membrane fluidity, insulin action and insulin binding. — J. Biol. Chem., 1979, vol. 254, p. 2619—2625.
- Avruch J., Nemenoff R. A., Blacksher P. J. et al. Insulin-stimulated tyrosine phosphorylation of the insulin receptor in detergent extracts of human placental membranes. Comparison to epidermal growth factor-stimulated phosphorylation. — J. Biol. Chem., 1982, vol. 257, p. 15162—15170.
- Baldwin D., Terris S., Steiner D. F. Characterisation of insulin-like actions of anti-insulin receptor antibodies. Effects on insulin binding, insulin degradation, and glycogen synthesis in isolated rat hepatocytes. — J. Biol. Chem., 1980, vol. 255, p. 4028—4034.
- Barazzone Ph., Carpentier J.-L., Gorden Ph. et al. Polar redistribution of ¹²⁵I-labeled insulin on the plasma membrane of cultured human lymphocytes. — Nature, 1980, vol. 286, p. 401—403.
- Baron M. D., Sönksen P. H. Elucidation of the quaternary structure of the insulin receptor. — Biochem. J., 1983, vol. 212, p. 79—84.
- Berhanu P., Olefsky J. M. Photoaffinity labeling of insulin receptors in viable cultured human lymphocytes. Demonstration of receptor shedding and degradation. — Diabetes, 1982, vol. 31, p. 410—417.
- Boeyhaems J. M., Dumont J. E. Outlines of receptor theory. Amsterdam; N. Y.; Oxford: Elsevier, 1980. 223 p.
- Caron M., Cherou G., Capeau J. et al. The insulin receptor glycosidic moiety: its characterization and role. — Reprod. Nutr. Develop., 1983, vol. 23, p. 367—376.
- Carpenter G., King L., Cohen S. Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations in vitro. — Nature, 1978, vol. 276, p. 409—410.
- Carpentier J.-L., Van Obberghen E., Gorden Ph., Orci L. Surface redistribution of ¹²⁵I-insulin in cultured human lymphocytes. — J. Cell Biol., 1981a, vol. 91, p. 17—25.
- Carpentier J.-L., Van Obberghen E., Gorden Ph., Orci L. Binding, membrane distribution, internalization and lysosomal association of ¹²⁵I-anti-insulin receptor antibody in IM-9-cultured human lymphocyte. — Exp. Cell Res., 1981b, vol. 134, p. 81—92.
- Clark S., Larknis R. G., Melnick R. A. Membrane fluidity and receptor aggregation in insulin-receptor interactions. — Diabetologia, 1980a, vol. 19, p. 265—273.
- Clark S., Larknis R. G., Melnick R. A. Negative cooperativity induced by desoctapeptide insulin unmasked by phospholipase treatment. — Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1980b, vol. 95, p. 1543—1549.
- Csaba G. Phylogeny and ontogeny of hormone receptors: the selection theory of receptor formation and hormonal imprinting. — Biol. Rev., 1980, vol. 55, p. 47—63.
- Cuatrecasas P. Isolation of the insulin receptor of liver and fat cell membranes. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972a, vol. 69, p. 318—322.
- Cuatrecasas P. Affinity chromatography and purification of the insulin receptor of liver cell membrane. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1972b, vol. 69, p. 1277—1281.

- Cuatrecasas P., Tell G. P. E. Insulin-like activity of concanavalin A and wheat germ agglutinin. Direct interactions with insulin receptors. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, vol. 70, p. 485—489.
- Czech M. P., Massague J. Subunit structure and dynamics of the insulin receptor. — *Fed. Proc.*, 1982, vol. 41, p. 2719—2723.
- Denton R. M., Brownsey R. W., Belsham G. J. A partial view of the mechanism of insulin action. — *Diabetologia*, 1981, vol. 21, p. 347—362.
- Desbuquos B., Lopez S., Burlet H. Ligand-induced translocation of insulin receptors in intact rat liver. — *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, p. 10852—10860.
- Deutsch P. J., Wan C. F., Rosen O. M., Rubin Ch. S. Latent insulin receptors and possible receptor precursors in 3T3-L1 adipocytes. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, p. 133—136.
- Donner D. B., Corin R. E. Formation of a receptor state from which insulin dissociates slowly in hepatic cells and plasma membranes. — *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, p. 9005—9008.
- Donner D. B., Yonkers K. Hormone-induced conformational changes in the hepatic insulin receptor. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 9413—9420.
- Eckel J., Reinauer H. Effect of EDTA on insulin binding and insulin action in isolated cardiocytes from adult rat. Evidence for a functional role of low-affinity insulin receptors. — *Diabetes*, 1984, vol. 33, p. 214—218.
- Fehlmann M., Carpentier J.-L., Le Cam A. et al. Biochemical and morphological evidence that the insulin receptor is internalized with insulin in hepatocytes. — *J. Cell Biol.*, 1983, vol. 93, p. 82—87.
- Fehlmann M., Carpentier J.-L., Van Obberghen J. L. et al. Internalized insulin receptors are recycled to the cell surface in rat hepatocytes. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, p. 5921—5925.
- Fehlmann M., Morin O., Kitabgi P., Fréychet P. Insulin and glucagon receptors of isolated rat hepatocytes: comparison between hormone binding and amino acid transport stimulation. — *Endocrinology*, 1981, vol. 109, p. 253—261.
- Feldman D., Do Y., Burshell A. et al. An estrogen-binding protein and endogenous ligand in *Sacharomyces cerevisiae*: possible hormone receptor system. — *Science*, 1982, vol. 218, p. 297—298.
- Flier J. S., Kahn C. R., Roth J., Bar R. S. Antibodies that impair insulin receptor binding in an unusual diabetic syndrome with severe insulin resistance. — *Science*, 1975, vol. 190, p. 63—65.
- Frank H. J. L., Davidson M. B. Failure of increased receptor occupancy to enhance the dissociation rate of bound insulin from rat hepatocytes. — In: *Current views on insulin receptors*. Serono Symp. London; N. Y.: Acad. Press, 1981, N 41, p. 151—157.
- Fujita-Yamaguchi Y. Characterization of purified insulin receptor subunits. — *J. Biol. Chem.*, 1984, vol. 259, p. 1206—1211.
- Fujita-Yamaguchi Y., Choi S., Sakamoto Y., Itakura K. Purification of insulin receptor with full binding activity. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 5045—5049.
- Gammeltoft S., Gliemann J. Binding and degradation of ¹²⁵I-labeled insulin by isolated rat fat cells. — *Biochim. et biophys. acta*, 1973, vol. 320, p. 16—32.
- Gavin J. R. III, Roth J., Neville D. M. Jr. et al. Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentrations: a direct demonstration in cell culture. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, vol. 71, p. 84—88.
- Ginsberg B. H., Braun T. J., Simon I., Spector A. A. Effect of the membrane lipid environment on the properties of insulin receptors. — *Diabetes*, 1981, vol. 30, p. 773—780.
- Ginsberg B. H., Kahn C. R., Roth J., De Meyts R. Insulin-induced dissociation of its receptor into subunits: possible molecular concomitant of negative cooperativity. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1976, vol. 73, p. 1068—1078.
- Goldfine I. D. Interaction of insulin, polypeptide hormones and growth factors with intracellular membranes. — *Biochim. et biophys. acta*, 1981, vol. 650, p. 53—67.
- Gorden Ph., Carpentier J.-L., Fan J. Y., Orci L. Receptor mediated endocytosis of polypeptide hormones: mechanism and significance. — *Metabolism*, 1982, vol. 31, p. 664—669.

- Gorden Ph., Carpentier J.-L., Freychet P., Oriol L. Internalization of polypeptide hormones. Mechanism, intracellular localization and significance. — *Diabetologia*, 1980, vol. 18, p. 263–274.
- Gould P. J., Ginsberg B. H., Spector A. A. Lipid effects on the binding properties of a reconstituted insulin receptor. — *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, p. 477–484.
- Green A., Frank B. H., Rubinstein A. et al. Characteristics of binding of a low affinity, noncooperative insulin ($[Leu^{B25}]$ insulin) to IM-9 lymphocytes. — *Endocrinology*, 1983, vol. 113, p. 1963–1971.
- Grigorescu F., White M. F., Kahn C. R. Insulin binding and insulin-independent phosphorylation of the insulin receptor solubilized from human erythrocytes. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 13708–13716.
- Grunberger G., Zick Y., Roth J., Gorden Ph. Protein kinase activity of the insulin receptor in human circulating and cultured mononuclear cells. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 115, p. 560–556.
- Grunfeld C., Baird K. L., Kahn C. R. Maintenance of 3T3-L1 cell in culture media containing saturated fatty acid decreases insulin binding and insulin action. — *Bioch. and Biophys. Res. Commun.*, 1981, vol. 103, p. 219–226.
- Harmon J. T., Hedo J. A., Kahn C. R. Characterization of a membrane regulator of insulin receptor affinity. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 6875–6881.
- Harmon J. T., Kahn C. R., Kempner E. S., Schlegel W. Characterization of the insulin receptor in its membrane environment by radiation inactivation. — *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, p. 3412–3419.
- Harmon J. T., Kempner E. S., Kahn C. R. Demonstration by radiation inactivation that insulin alters the structure of the insulin receptor in rat liver membranes. — *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, p. 7719–7722.
- Harrison L. C., Itin A. Purification of the insulin receptor from human placenta by chromatography on immobilized wheat germ lectin and receptor antibody. — *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, p. 12066–12072.
- Havrankova J., Brownstein M. J., Roth J. Insulin receptors are widely distributed in the central nervous system of the rat. — *Nature*, 1978, vol. 272, p. 827–829.
- Hedo J. A., Kahn C. R., Hayashi M. et al. Biosynthesis and glycosylation of the insulin receptor. Evidence for a single polypeptide precursor of the two major subunits. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 10020–10026.
- Heidenreich K. A., Zahniser N. R., Berhanu P. et al. Structural differences between insulin receptors in the brain and peripheral target tissues. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 8527–8530.
- Herzberg V., Boughter J. M., Cazlisle S., Hill D. E. Evidence for two insulin receptor populations on human erythrocytes. — *Nature*, 1980, vol. 286, p. 279–281.
- Hofmann C. A., Lotan R. M., Ku W. W., Oeltmann T. N. Insulin-ricin B hybrid molecules mediate an insulin-associated effect on cell which do not bind insulin. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 11774–11779.
- Jacobs S., Hazum E., Cuatrecasas P. The subunit structure of rat liver insulin receptor. Antibodies directed against the insulin-binding subunits. — *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, p. 6937–6940.
- Jacobs S., Kull F. C. Jr., Cuatrecasas P. Monensin blocks maturation of receptors for insulin and somatomedin C: identification of receptor precursors. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, p. 1228–1231.
- Jacobs S., Schechter Y., Bissell K., Cuatrecasas P. Purification and properties of insulin receptors from rat liver membranes. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1977, vol. 77, p. 981–988.
- Jarett L., Kiechle F. L., Parker J. C. Chemical mediator or mediators of insulin action: response to insulin and mode of action. — *Fed. Proc.*, 1982, vol. 41, p. 2736–2741.
- Jarett L., Smith R. M. Partial disruption of naturally occurring groups of insulin receptors on adipocyte plasma membranes by dithiothreitol and N-ethylmaleimide: the role of disulfide bonds. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983, vol. 80, p. 1023–1027.
- Jarret D. B., Roth J., Kahn C. R., Flier J. S. Direct method for detection and characterization of cell surface receptors for insulin by means of ^{125}I -labeled autoantibodies to receptors. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, vol. 73, p. 4115–4119.
- Kahn C. R., Baird K. L., Jarret D. B., Flier J. S. Direct demonstration that receptor

- crosslinking or aggregation is important in insulin action. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, p. 4209—4213.
- Kahn C. R., Freychet P., Roth J., Neville D. M.** Quantitative aspects of the insulin-receptor interaction in liver plasma membranes. — *J. Biol. Chem.*, 1974, vol. 249, p. 2249—2257.
- Kahn C. R., Van Obberghen E., King C. L. et al.** Antibodies to insulin receptors as probes of insulin action. In: *Current views on insulin receptors. Serono Symp.* London; N. Y.: Acad. Press, 1981, N 41, p. 261—273.
- Kasuga M., Carpentier J.-L., Van Obberghen E. et al.** ¹²⁵I-anti-insulin receptor fab is internalized by cultured human lymphocytes. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1983a, vol. 114, p. 230—233.
- Kasuga M., Fujita-Yamaguchi Y., Blithe D. L., Kahn C. R.** Tyrosine-specific protein kinase activity is associated with the purified insulin receptor. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983b, vol. 80, p. 2137—2141.
- Kasuga M., Fujita-Yamaguchi Y., Blithe D. L. et al.** Characterization of the insulin receptor kinase purified from human placental membranes. — *J. Biol. Chem.*, 1983c, vol. 258, p. 10973—10980.
- Kasuga M., Hedo J. A., Yamada K. M., Kahn C. R.** The structure of insulin receptor and its subunits. Evidence for multiple nonreduced forms and A 210000 possible proreceptor. — *J. Biol. Chem.*, 1982a, vol. 257, p. 10392—10396.
- Kasuga M., Kahn C. R., Hedo J. A. et al.** Insulin-induced receptor loss in cultured human lymphocytes is due to accelerated receptor degradation. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, p. 6917—6921.
- Kasuga M., Karlson F. A., Kahn C. R.** Insulin stimulates the phosphorylation of the 95000-dalton subunit of its own receptor. — *Science*, 1982b, vol. 215, p. 185—187.
- Kasuga M., Zick Y., Blithe D. B. et al.** Insulin stimulation of phosphorylation of the β -subunit of the insulin receptor. Formation of both phosphoserine and phosphotyrosine. — *J. Biol. Chem.*, 1982c, vol. 257, p. 9891—9894.
- King A. C., Cuatrecasas P.** Peptide hormone-induced receptor mobility, aggregation, and internalization. — *N. Engl. J. Med.*, 1981, vol. 305, p. 77—88.
- King G. L., Kahn C. R., Rechler M. M., Nissley S. P.** Direct demonstration of separate receptors for growth and metabolic activities of insulin and multiplication-stimulating activity (an insulin like growth factor) using antibodies to the insulin receptor. — *J. Clin. Invest.*, 1980, vol. 66, p. 130—140.
- Knutson V. P., Ronnett G. V., Lane M. D.** Rapid reversible internalization of cell surface insulin receptors. Correlation with insulin-induced down regulation. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 12139—12142.
- Kosmakos F. C., Roth J.** Insulin-induced loss of insulin receptor in IM-9 lymphocytes. — *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, p. 9860—9869.
- Krupp M. N., Lane M. D.** Evidence for different pathways for the degradation of insulin and insulin receptor in the chick liver cells. — *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, p. 1372—1377.
- Krupp M. N., Livingston J. N.** Insulin binding to solubilized material from fat cell membranes: evidence for two binding species. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, p. 2593—2597.
- Kull F. C. Jr., Jacobs S., Su Y. et al.** Monoclonal antibodies that crossreact with receptors for insulin and somatomedin-C. — in: *The Amer. endocrine Soc., 64th annual meet. Progr. and abstr.* San Francisco, 1982, p. 260.
- Larner J., Cheng K., Schwartz C. et al.** A proteolytic mechanism for the action of insulin via oligopeptide mediator formation. — *Fed. Proc.*, 1982, vol. 41, p. 2724—2729.
- Le Cam A., Maxfeld F., Willingham M., Pastan I.** Insulin stimulation of amino acid transport in isolated rat hepatocytes is independent of hormone internalization. — *Bioch. and Biophys. Res. Commun.*, 1979, vol. 88, p. 873—881.
- Lerea K. M., Livingston J. N.** The different receptor species of liver have similar complex insulin binding properties. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1983, vol. 114, p. 1042—1047.
- Massague J., Pilch P. F., Czech M. P.** A unique proteolytic cleavage site on the subunit of the insulin receptor. — *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, p. 3182—3190.
- Maturo J. M., Holenberg M. D.** Insulin receptor: interaction with nonreceptor glycopro-

- tein from liver cell membranes. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, vol. 75, p. 3070—3074.
- McCaleb M. L., Donner D. B. Affinity of the hepatic insulin receptor is influenced by membrane phospholipids. — *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, p. 11051—11057.
- Meyts P. de, Roth J. Cooperativity in ligand binding: a new graphic analysis. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1975, vol. 66, p. 1118—1126.
- Meyts P. de, Roth J., Neville D. M. et al. Insulin interactions with its receptors: experimental evidence for negative cooperativity. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1973, vol. 55, p. 154—161.
- Muggeo M., Bar R. S., Roth J. Change in affinity of insulin receptors following oral glucose in normal adults. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1977, vol. 44, p. 1206—1209.
- Muggeo M., Ginsberg B. H., Roth J. et al. The insulin receptor in vertebrates is functionally more conserved during evolution than insulin itself. — *Endocrinology*, 1979a, vol. 104, p. 1393—1402.
- Muggeo M., Kahn C. R., Bar R. S. et al. The underlying insulin receptor in patients with antireceptor autoantibodies: demonstration of normal binding and immunological properties. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1979b, vol. 49, p. 110—119.
- Muggeo M., Van Obberghen E., Kahn C. R. et al. The insulin receptor and insulin of the Atlantic hagfish. Extraordinary conservation of binding specificity and negative cooperativity in the most primitive vertebrate. — *Diabetes*, 1979c, vol. 28, p. 175—181.
- Neufeld N. D., Corbo L. Increased fetal insulin receptors and changes in membrane fluidity and lipid composition. — *Amer. J. Physiol.*, 1982a, vol. 243, p. E246—E250.
- Neufeld N. D., Corbo L. Increased cord monocyte insulin receptors: association with membrane lipid properties. — In: *The Amer. endocrine soc., 64 th annual meet. Progr. and abstr. San Francisco*, 1982b, p. 336.
- Olefsky J. M., Marshall S., Berhanu P. et al. Internalization and intracellular processing of insulin and insulin receptors in adipocytes. — *Metabolism*, 1982, vol. 31, p. 670—692.
- Olefsky J. M., Colterman O. Q. The insulin receptor in physiological and pathological conditions. In: *Current views on insulin receptors. Serono Symp. London; N. Y.; Acad. Press*, 1981, N 41, p. 463—488.
- Pang D. T., Shafer J. A. Stoichiometry for the binding of insulin to insulin receptors in adipocyte membranes. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 2514—2520.
- Pastan I. H., Willingham M. C. Journey to the center of the cell: role of the receptor. — *Science*, 1981, vol. 214, p. 504—509.
- Petruzzelli L. M., Ganguly S., Smith C. R. et al. Insulin activates a tyrosine-specific protein kinase in extracts of 3T3-L1 adipocytes and human placenta. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, p. 6792—6796.
- Pilch P. F., Czech M. P. Interaction of cross-linking agents with the insulin effector system of isolated fat cells. — *J. Biol. Chem.*, 1979, vol. 254, p. 3375—3381.
- Pilch P. F., Czech M. P. Hormone binding alters the conformation of the insulin receptor. — *Science*, 1980, vol. 210, p. 1152—1153.
- Pilch P. F., Shia M. A., Robin J. et al. Coated vesicles participate in the receptor-mediated endocytosis of insulin. — *J. Cell Biol.*, 1983, vol. 96, p. 113—138.
- Pollet R. L., Kempner E. S., Standaert M. L., Haase B. A. Structure of the insulin receptor of the cultured human lymphoblastoid cell IM-9. Evidence suggesting that two subunits are required for insulin binding. — *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, p. 894—896.
- Pollet R. L., Mary L., Stanaert M. L., Haase B. A. Insulin binding to the human lymphocyte receptor. Evaluation of the negative cooperativity model. — *J. Biol. Chem.*, 1977, vol. 252, p. 5828—5834.
- Pottik L. A., Moxley R. T. III, Livingston J. N. Tissue changes in insulin binding characteristics induced by wheat germ agglutinin. — *Diabetes*, 1981, vol. 30, p. 196—202.
- Purrello F., Burnham D. B., Goldfine I. D. Insulin receptor antiserum and plant lectins mimic the direct effects of insulin on nuclear envelope phosphorylation. — *Science*, 1983a, vol. 221, p. 462—464.

- Purrello F., Burnham D. B., Goldfine I. D. Insulin regulation of protein phosphorylation in isolated rat liver nuclear envelopes: potential relationship to mRNA metabolism. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1983b, vol. 80, p. 1189–1193.
- Reed B. C., Lane M. D. Insulin receptor synthesis and turnover in differentiating 3T3-L1 preadipocytes. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, p. 285–289.
- Ronnet G. V., Knutson V. P., Lane M. D. Insulin-induced down-regulation of insulin receptor in 3T3-L1 adipocytes. Altered rate of receptor inactivation. — *J. Biol. Chem.*, 1982, vol. 257, p. 4285–4291.
- Roth J., Le Roith D., Shiloach J. et al. The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters, and other extracellular chemical messengers. Implications for mammalian biology. — *New Engl. J. Med.*, 1982, vol. 306, p. 523–527.
- Roth R. A., Cassell D. J. Insulin receptor: evidence that it is a protein kinase. — *Science*, 1983, vol. 219, p. 299–301.
- Roth R. A., Cassell D. J., Wong K. Y. et al. Monoclonal antibodies to insulin receptor block insulin binding and inhibit insulin action. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1982, vol. 79, p. 7312–7316.
- Roth R. A., Maddux B. Insulin-cholera toxin binding unit conjugate: a hybrid molecule with insulin biological activity and cholera toxin binding specificity. — *J. Cell. Physiol.*, 1983, vol. 115, p. 151–158.
- Roth R. A., Maddux B., Cassell D. J., Goldfine I. D. Regulation of the insulin receptor by a monoclonal anti-receptor antibody. Evidence that receptor down-regulation can be independent of insulin action. — *J. Biol. Chem.*, 1983a, vol. 258, p. 12094–12097.
- Roth R. A., Maddux B., Wong K. Y. et al. Interactions of a monoclonal antibody to the insulin receptor with receptors for insulinlike growth factors. — *Endocrinology*, 1983b, vol. 112, p. 1865–1967.
- Roth R. A., Mesirow M. L., Cassell D. J. Preferential degradation of the β -subunit of purified insulin receptor. Effect on insulin binding and protein kinase activities of the receptor. — *J. Biol. Chem.*, 1983c, vol. 258, p. 14456–14460.
- Santora A. C. II, Wheeler F. B., De Haan R. L., Elsas L. J. II. Relationship of insulin binding to amino acid transport by cultured 14-day embryonic chick heart cells. — *Endocrinology*, 1979, vol. 104, p. 1059–1068.
- Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. — *Amer. N. Y. Acad. Sci.*, 1949, vol. 51, p. 660–675.
- Schlessinger J. The mechanism and role of hormone-induced clustering of membrane receptors. — *Trends Biochem. Sci.*, 1980, p. 210–214.
- Schlessinger J., Van Obberghen E., Kahn C. R. Insulin and antibodies against insulin receptor cap on the membrane of cultured human lymphocytes. — *Nature*, 1980, vol. 286, p. 729–731.
- Seals J. R., Czech M. P. Production by plasma membranes of a chemical mediator of insulin action. — *Fed. Proc.*, 1982, vol. 41, p. 2730–2735.
- Shia M. A., Rubin J. B., Pilch P. F. The insulin receptor protein kinase physicochemical requirements for activity. — *J. Biol. Chem.*, 1983, vol. 258, p. 14450–14455.
- Shinitzky M., Henkart P. Fluidity of cell membranes — current concepts and trends. — *Int. Rev. Cytol.*, 1980, vol. 60, p. 121–147.
- Simpson I. A., Hedo J. A. Insulin receptor phosphorylation may not be a prerequisite for acute insulin action. — *Science*, 1984, vol. 223, p. 1301–1304.
- Smith R. M., Jarett L. Quantitative ultrastructural analysis of receptor-mediated insulin uptake into adipocytes. — *J. Cell. Physiol.*, 1983, vol. 115, p. 119–207.
- Steinman R. M., Mellman J. S., Muller W. A., Cohn Z. A. Endocytosis and recycling of plasma membrane. — *J. Cell Biol.*, 1983, vol. 96, p. 1–27.
- Terris S., Steiner D. F. Binding and degradation of ^{125}I -insulin by rat hepatocytes. — *J. Biol. Chem.*, 1975, vol. 250, p. 8389–8398.
- Van Obberghen E., Kasuga M., Hedo J. A. The structure of the insulin receptor studies using external and internal labeling techniques. — *Reprod. Nutr. Develop.*, 1983a, vol. 23, p. 357–366.
- Van Obberghen E., Kasuga M., Le Cam A. et al. Biosynthetic labeling of insulin receptor: studies of subunits in cultured human IM-9 lymphocytes. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1981, vol. 78, p. 1052–1056.
- Van Obberghen E., Rossi B., Kowalski A. et al. Receptor-mediated phosphorylation of the hepatic insulin receptor: evidence that the M 95,000 receptor sub-

nit is its own kinase. — Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1983b, vol. 80, p. 945—949.

Vip C. C., Moule M. L. Insulin receptor: its subunit structure as determined by photo affinity labeling. — Fed. Proc., 1983, vol. 42, p. 2842—2845.

Vip C. C., Veung C. W. T., Moule M. L. Photoaffinity labeling of insulin receptor of rat adipocyte plasma membrane. — J. Biol. Chem., 1978, vol. 153, p. 1743—1745.

Wang Chin-chen, Sonne O., Hedo J. A. et al. Insulin-induced internalization of the insulin receptor in the isolated rat adipose cell. — J. Biol. Chem., 1983, vol. 258, p. 5129—5134.

Weiss M., Inabar S. H., Winblad S., Kaspar D. L. Demonstration of a saturable binding site for thyrotropin in *Versinia enterocolitica*. — Scienc, 1983, vol. 219, p. 1331—1333.

Zick V., Ress-Jones R. W., Taylor S. I. et al. The role of antireceptor antibodies in stimulating phosphorylation of the insulin receptor. — J. Biol. Chem., 1984, vol. 259, p. 4396—4400.

Глава 7

РОЛЬ ИНСУЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА

Инсулиновые рецепторы являются начальной точкой приложения действия инсулина в клетке. С изменением состояния инсулиновых рецепторов меняется чувствительность тканей к инсулину, что может привести к нарушению тех путей тканевого метаболизма, которые нуждаются в данном гормоне. В наибольшей степени это относится к углеводному обмену. Поэтому не случайно, что в последние 10 лет интенсивно изучается роль инсулиновых рецепторов в патогенезе сахарного диабета. Этот период стал новой значительной вехой в диабетологии.

В изучении инсулиновых рецепторов у человека использовались различные типы клеток. Наиболее доступными в таких исследованиях остаются клетки крови: моноциты, эритроциты и лимфоциты, хотя они и не являются классическими инсулинзависимыми объектами в отношении метаболизма глюкозы. Поэтому, чтобы охарактеризовать действие инсулина на клеточном уровне и сопоставить его с уровнем рецепторного связывания, было бы более целесообразно исследовать клетки тканей-мишеней для инсулина, таких как печень, скелетные мышцы, жировая ткань. Однако в условиях клиники провести подобные исследования практически невозможно, и поэтому они единичны и ограничены в основном исследованием жировых клеток. Имеются также работы, выполненные на фибробластах кожи и на клетках плаценты человека. Для любого типа изученных клеток выявлены высокая специфичность рецепторов к инсулину, а также идентичность условий, необходимых для максимального проявления инсулин-рецепторного взаимодействия.

Очень важно установить, существует ли однонаправленность в изменении инсулиновых рецепторов на разных клетках организма при тех или иных воздействиях. Такие исследования пока немногочисленны, и результаты их противоречивы. Возможно, что отсутствие полной аналогии в инсулин-рецепторных характе-

ридиках, полученных на эритроцитах, моноцитах и адипоцитах в некоторых исследованиях, обусловлено в какой-то мере тканевой специфичностью. В частности, эритроциты в отличие от других клеток не имеют ядра, и следовательно, не способны к синтезу белка, в том числе и белка рецептора. Эритроциты имеют более продолжительный период жизни в циркуляции, чем другие клетки крови. Может быть, поэтому в некоторых исследованиях не отмечено полной идентичности рецепторного связывания инсулина моноцитами и эритроцитами при быстро меняющихся условиях. Эритроциты являются более «ригидными» клетками для проявления изменчивости инсулин-рецепторной активности. Вследствие этого предпочтительно использовать их для изучения рецепторов при длительно существующих физиологических или патологических состояниях. Интересно, что даже в пределах одной и той же популяции клеток, но на разных стадиях развития (эритробласты, ретикулоциты, молодые и зрелые эритроциты) рецепторные параметры варьируют, обнаруживая более высокую связующую способность менее зрелых клеток (Ivarsson, Thorell, 1981; Ginsberg, Brown, 1982). По-видимому, экстраполяция данных, полученных на инсулиновых рецепторах одних клеток, на другие не всегда правомерна.

Рассматривая систему инсулин-инсулиновый рецептор при сахарном диабете, необходимо учитывать особенности патогенеза этого заболевания. По современной классификации сахарный диабет делится на два основных типа: инсулинзависимый (I тип) и инсулиннезависимый (II тип).

В отдельную форму выделяется нарушение толерантности к глюкозе, которое может быть предстадией сахарного диабета. Согласно принятой классификации, существует, помимо спонтанного, сахарный диабет, сопровождающий другие болезни гормональной природы и определенные редкие генетически детерминированные синдромы, характеризующиеся выраженной инсулин-резистентностью.

Участие инсулиновых рецепторов в генезе нарушений метаболизма неравнозначно при разных типах сахарного диабета, поэтому целесообразно рассмотреть состояние этих рецепторов и характер их взаимодействия с инсулином отдельно для каждого из указанных типов заболевания.

ТИП I, ИНСУЛИНЗАВИСИМЫЙ САХАРНЫЙ ДИАБЕТ (ИЗСД)

Это заболевание возникает чаще в период роста организма и редко сочетается с ожирением. Свойственные ему нарушения метаболизма обусловлены недостаточной секрецией инсулина, возникающей в результате резкого уменьшения количества В-клеток в поджелудочной железе. По этиологии оно гетерогенно и развивается либо вследствие аутосомных нарушений, либо вследствие вирусной инфекции, поражающей В-клетки с последующим развитием аутоиммунных реакций. Заболевание имеет длительный

предиабетический период, включая и стадию нарушений толерантности к глюкозе. Больные с этим типом сахарного диабета нуждаются в заместительной терапии инсулином, так как секреция собственного инсулина у них уменьшена или совсем отсутствует.

Поскольку твердо установлен факт саморегулирующей роли инсулина относительно концентрации специфических рецепторов, то уместно предположить, что, подчиняясь этому механизму «обратной регуляции», недостаток эндогенного инсулина должен коррелировать с повышенным количеством инсулиновых рецепторов на тканевых клетках и с усиленным связыванием инсулина у больных с ИЗСД. В экспериментах на крысах со стрептозотоциновым диабетом (панкреатогенным), действительно, обнаружено увеличение концентрации инсулиновых рецепторов на плазматических мембранах печени (Davidson, Kaplan, 1977) и на жировых клетках (Kobayashi, Olefsky, 1979). У китайских хомячков с генетическим, склонным к кетозу инсулиндефицитным сахарным диабетом выявлены те же особенности инсулин-рецепторного взаимодействия на плазматических мембранах печени (Hepp et al., 1975). У людей с сахарным диабетом, вторично развившимся после панкреатэктомии, связывание инсулина специфическими рецепторами и количество их на моноцитах и эритроцитах было вдвое большим, чем у здоровых лиц (Muggeo et al., 1980a).

Сравнительное изучение инсулин-рецепторного связывания и чувствительности к инсулину, проведенное у больных с сахарным диабетом, развившимся после панкреатэктомии, и у больных со спонтанным ИЗСД выявило большие различия в этих параметрах, несмотря на общую для обеих форм сахарного диабета инсулиновую недостаточность. Оказалось, что у больных, перенесших панкреатэктомию, связывание инсулина рецепторами на эритроцитах было значительно повышено за счет возрастания концентрации инсулиновых рецепторов, тогда как у больных с ИЗСД оно было снижено. Уровень инсулин-рецепторной активности коррелировал со степенью чувствительности к инсулину и с потребностью в лечебных дозах инсулина у больных обеих групп (Nosadini et al., 1981).

Данные литературы о характере инсулин-рецепторных взаимодействий и о чувствительности к инсулину у больных с ИЗСД свидетельствуют о вариабельности результатов. Так, у больных с впервые обнаруженным нелеченным ИЗСД связывание инсулина рецепторами на эритроцитах и моноцитах варьировало от низкого до высокого, у больных с продолжительным и хорошо компенсированным сахарным диабетом оно было таким же, как у здоровых лиц (Fantus et al., 1981; Pedersen, 1984). Авторы этих исследований видят объяснение вариабельности интенсивности инсулин-рецепторного взаимодействия в различном уровне инсулина в циркуляции и в свойственном инсулину механизме саморегуляции своих рецепторов. Вероятно, поэтому у больных с нелеченным сахарным диабетом, у которых почти отсутствовал инсулин в циркуляции, рецепторное связывание его было высоким, как и количество и

сродство инсулиновых рецепторов на моноцитах и эритроцитах. Лечение таких больных инсулином в течение 10 дней привело к снижению этих показателей. У пациентов с менее выраженным дефицитом инсулина в крови и с пониженным его рецепторным связыванием последнее в результате лечения возросло до нормы. При этом улучшились обменные показатели организма (Pedersen, 1984).

В некоторых работах было констатировано нормальное взаимодействие инсулина со специфическими рецепторами на эритроцитах у детей и подростков с ИЗСД (Karry et al., 1980; Zick et al., 1983). При этом одни авторы заключали, что этот показатель не зависит ни от продолжительности диабета, ни от степени его компенсации и вообще мало значим в патогенезе ИЗСД (Karry et al., 1980). Другие (Zick et al., 1983) доказали, что этот процесс чувствителен к воздействиям. Например, переход в терапии со свиного инсулина на биосинтетический «Novo» хотя и не изменил общего характера связывания инсулина, но повысил сродство рецепторов к гормону и снизил их количество на клетках.

В ряде исследований инсулин-рецепторное взаимодействие изучалось параллельно на клетках тканей-мишеней для инсулина и на клетках крови. Такое сравнительное изучение было проведено на эритроцитах, моноцитах и адипоцитах у больных с длительно леченным (более 10 лет) ИЗСД (Pedersen, 1984). Несмотря на нормальное связывание инсулина рецепторами на моноцитах и эритроцитах, оно оказалось сниженным на жировых клетках. Авторы пытаются объяснить этот феномен повышенной инсулинизацией периферических тканей, в частности, жировой ткани за счет высокого уровня инсулина в ней экзогенного происхождения и подавляющим влиянием его на инсулиновые рецепторы. Клетки же крови могут быть адаптированы к более высоким концентрациям гормона, и поэтому при введении экзогенного инсулина равновесие между уровнем его в крови и уровнем связывания инсулиновыми рецепторами на клетках крови может заметно не изменяться.

Сниженный уровень рецепторного связывания инсулина на эритроцитах крови был найден у больных с ИЗСД, получающих инсулиноотерпию (Eaton et al., 1981), а также на плацентарных мембранах у матерей с ИЗСД (Haggison et al., 1977).

Нами изучены инсулин-рецепторные связи у больных с ИЗСД, имевших выраженную инсулинрезистентность, которая проявлялась в том, что ежедневная лечебная доза инсулина превосходила 100 ед. (в среднем была 150 ед.). К моменту исследования диабетические нарушения у больных были компенсированы, что подтверждалось нормогликемией натощак и отсутствием кетоацидоза. Связывание инсулина специфическими рецепторами на эритроцитах оказалось значительно меньшим, чем у здоровых лиц, причем это снижение определялось уменьшением концентрации рецепторов на эритроцитах (рис. 1).

Таким образом, несмотря на противоречивость литературных данных, следует заключить, что у больных с ИЗСД интенсивность рецепторного связывания инсулина тканевыми клетками весьма

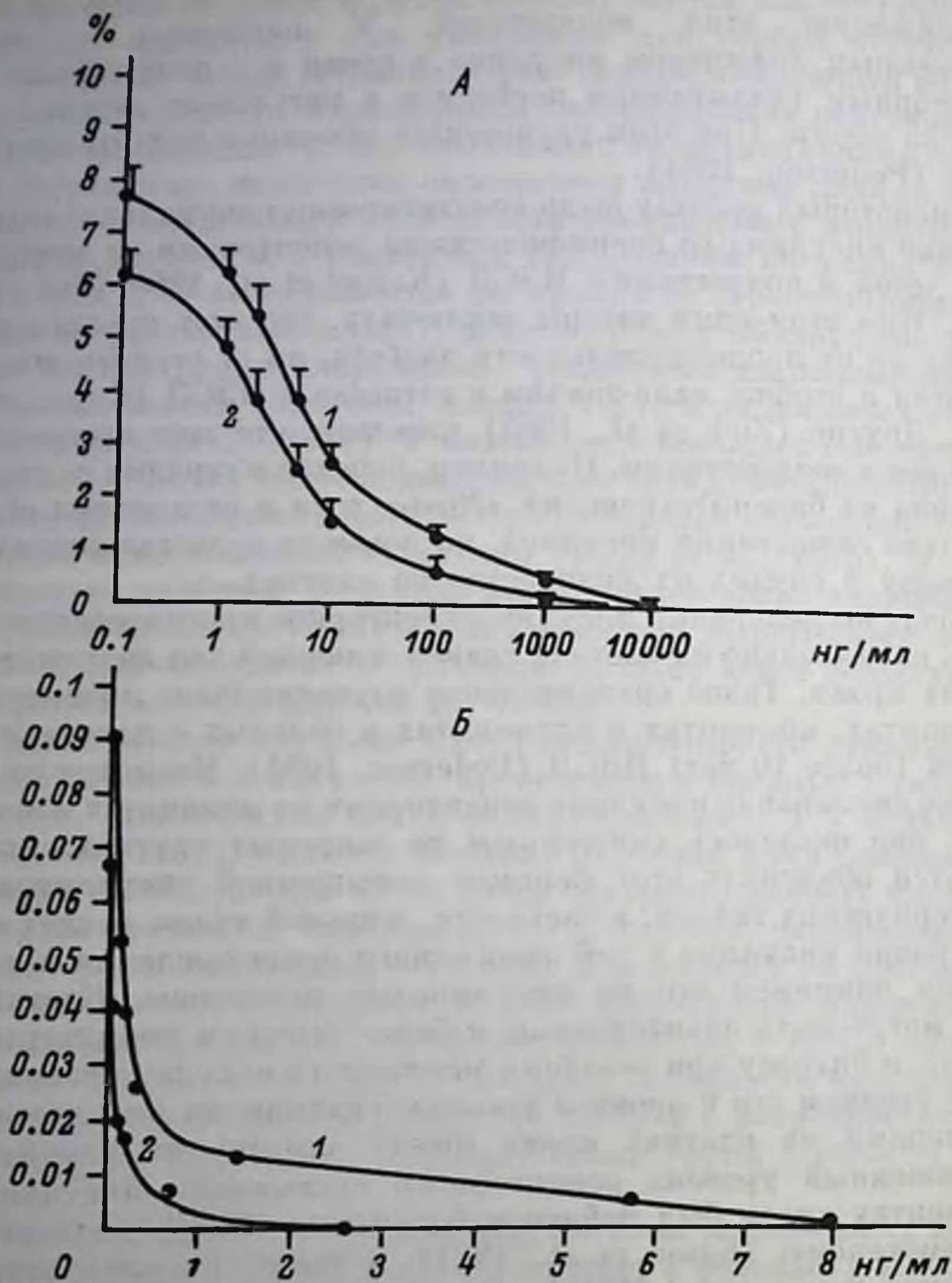


Рис. 1. Анализ инсулин-рецепторных взаимодействий у больных с инсулинзависимым сахарным диабетом, резистентным к инсулинотерапии.

А — кривые конкурентного вытеснения ¹²⁵I инсулина немеченым инсулином в разных концентрациях в эритроцитах здоровых лиц (1) и больных сахарным диабетом (2). По оси абсцисс: логарифм концентрации немеченого инсулина, нг/мл; по оси ординат: специфическое связывание ¹²⁵I инсулина эритроцитами, % от общего инсулина при расчете на 3.6×10^9 клеток/мл. Б — те же данные в координатах графика Скэтчарда. По оси абсцисс: связанный инсулин, в нг/мл в расчете на 3.6×10^9 кл/мл; по оси ординат: отношение ¹²⁵I инсулина связанного к свободному.

вариабельна и отрицательно коррелирует с уровнем инсулина как эндогенного, так и экзогенного происхождения в циркуляции.

Изменение состояния инсулиновых рецепторов, как правило, сочетается с изменением чувствительности к инсулину. В одной из работ (Ginsberg, 1977) было показано, что у больных с ИЗСД чувствительность к инсулину, определявшаяся по скорости утилизации глюкозы в ответ на введение инсулина, не уменьшена. Однако большинство исследователей обнаружило инсулинрезистентность у больных как с компенсированным, так и с некомпенсированным диабетом, причем она проявлялась преимущественно со стороны периферических тканей, но не печени (De Fronzo et al., 1981; Nagano et al., 1981; Proietto et al., 1983).

Интересно сопоставить характер специфического связывания инсулина на определенных тканевых клетках и состояние обменных процессов в этих клетках под влиянием инсулина. Такое исследование было проведено и показало низкий уровень связывания инсулина и уменьшение количества инсулиновых рецепторов на адипоцитах у больных с длительно леченным ИЗСД (Pedersen, 1984). При этом отмечено снижение транспорта глюкозы в жировые клетки, уменьшение блокирующего липолиз эффекта инсулина. Однако эти отклонения были выявлены при небольших, близких к физиологическим дозах инсулина, тогда как на максимально эффективную в норме дозу инсулина ответ был интенсивным. Это свидетельствовало о понижении чувствительности к инсулину со стороны жировых клеток, т. е. о наличии инсулинрезистентности, локализованной на уровне рецепторов. Наряду с этими нарушениями авторы выявили недостаточность окисления глюкозы и недостаточность липогенеза в жировых клетках, проявлявшиеся как в базальных условиях, так и при стимуляции инсулином в любых его концентрациях. Это указывало на более глубокий дефект в клетках, т. е. на инсулинрезистентность, локализованную не только на уровне рецепторов, но и в пострецепторных внутриклеточных системах.

Изучение зависимости между дозой инсулина и характером изменения одного из метаболических процессов (получение кривых доза-ответ) оказывает существенную помощь в анализе причин инсулинрезистентности. Такого характера исследование проведено на больных с длительным (в среднем 19 лет) ИЗСД (Pernot et al., 1984). Отмечено, что при физиологическом уровне инсулина в крови утилизация глюкозы у больных осуществляется в меньшей мере, чем у здоровых, однако при гиперинсулинемии этот процесс возрастал до нормы. Исходя из этого, сделано заключение, что у больных с длительно существующим ИЗСД имеется резистентность к инсулину, проявляющаяся понижением чувствительности на пороговые физиологические дозы инсулина, но на максимальные концентрации его ответ не нарушен. Следовательно, дефект проявлялся только на уровне связывания инсулина клеточными рецепторами в инсулинзависимых тканях (мышечной, жировой). Со стороны печени инсулинрезистентность в данном исследовании не

была выявлена, поскольку при любых концентрациях инсулина в крови блокировалось выделение глюкозы из печени.

Наличие резистентности к инсулину у большинства больных с ИЗСД подтверждается и тем фактом, что лечебная доза инсулина у них превышает 30—40 ед. в день, т. е. то количество инсулина, которое секретируется поджелудочной железой за сутки.

Итак, при ИЗСД, первично обусловленном абсолютной инсулиновой недостаточностью, вторично развивается инсулинрезистентность, которая зависит от состояния инсулиновых рецепторов. Причины инсулинрезистентности многочисленны, и они хорошо раскрыты в обзорах (Kahn, 1980; Olefsky, 1981).

Резистентность к действию инсулина при сахарном диабете может быть обусловлена нарушениями на пререцепторном, рецепторном и пострецепторном уровнях. К пререцепторному уровню относится инсулинрезистентность, которая может возникнуть в результате секреции аномального инсулина, отличающегося малым биологическим эффектом. Описаны пока единичные случаи сахарного диабета, характеризующегося наличием аномального по структуре инсулина. Такой инсулин слабо связывается специфическими рецепторами. К экзогенному инсулину такие больные высокочувствительны (Haneda, 1982; Schröder, Zühlke, 1982).

Другая причина инсулинрезистентности пререцепторного типа при ИЗСД заключается в наличии в циркуляции антагонистов инсулина. Они могут быть гормональной и негормональной природы. Гормональные включают глюкагон, катехоламины, кортизол, гормон роста. Уровень их в крови повышается у больных с плохо компенсированным сахарным диабетом. Эти гормоны являются контринсулярными по механизму действия на некоторые метаболические процессы. Однако антагонизм их в отношении действия инсулина проявляется и на уровне инсулинрецепторной системы.

Гормональный профиль резко изменяется при беременности, когда нарастают уровни кортизола, гормона роста, прогестерона, эстрогенов, плацентарного лактогена. Беременность характеризуется возникновением инсулинрезистентности. У больных с сахарным диабетом она особенно выражена, так как при беременности у них утяжеляется сахарный диабет и возрастают в 2—3 раза лечебные дозы инсулина. Изучение инсулинрецепторных характеристик у больных сахарным диабетом при беременности представляет значительный интерес. Нами в таком исследовании показано, что несмотря на удовлетворительное состояние диабета (нормогликемия натощак и в течение дня, отсутствие кетоацидоза), связывание инсулина рецепторами на эритроцитах было значительно снижено по сравнению со здоровыми женщинами с беременностью таких же сроков. Это снижение обуславливалось в большей степени уменьшением концентрации рецепторов на клетках и в меньшей степени — снижением сродства рецепторов к инсулину (рис. 2). О том же свидетельствуют результаты ряда других авторов (Gatagos et al., 1981; Toyoda, 1983).

К антагонистам инсулина негормональной природы относятся

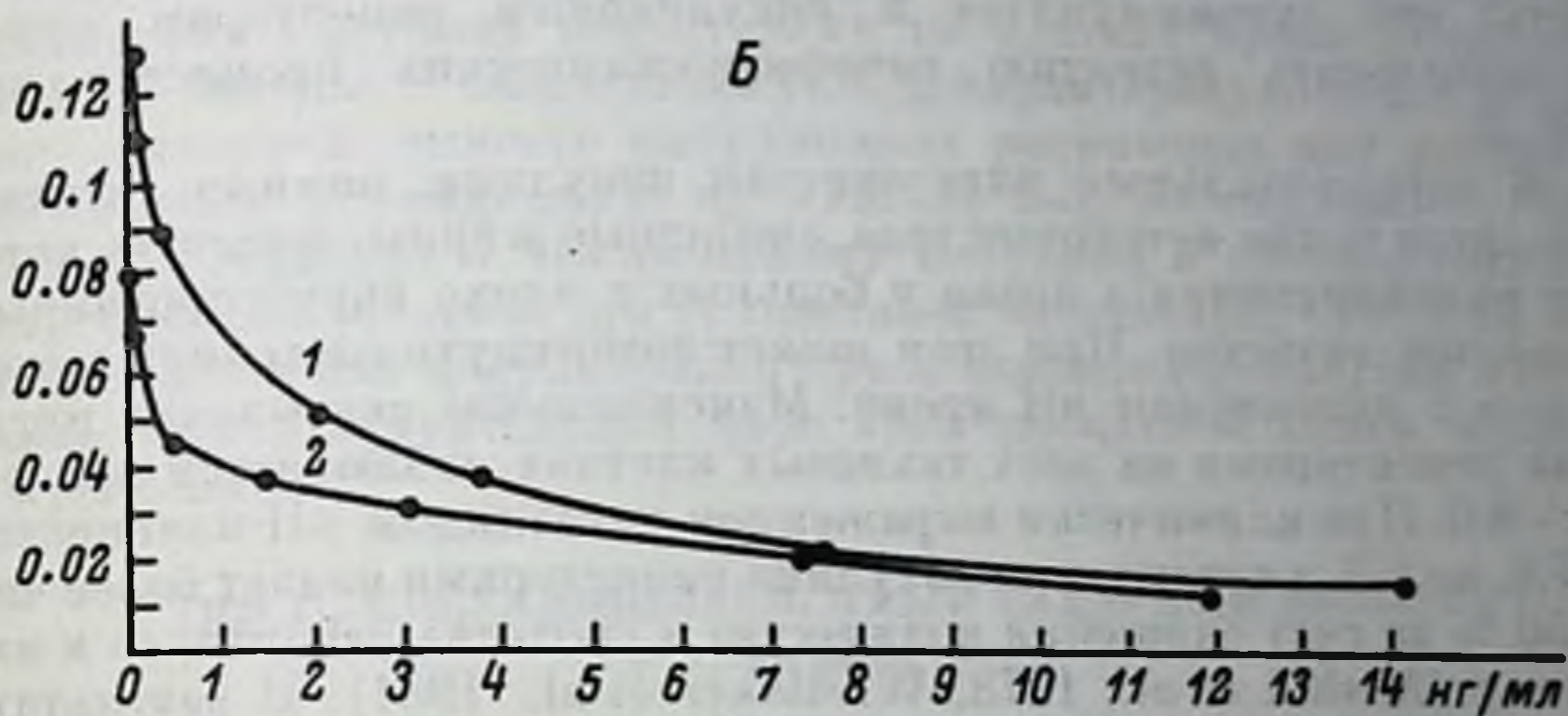
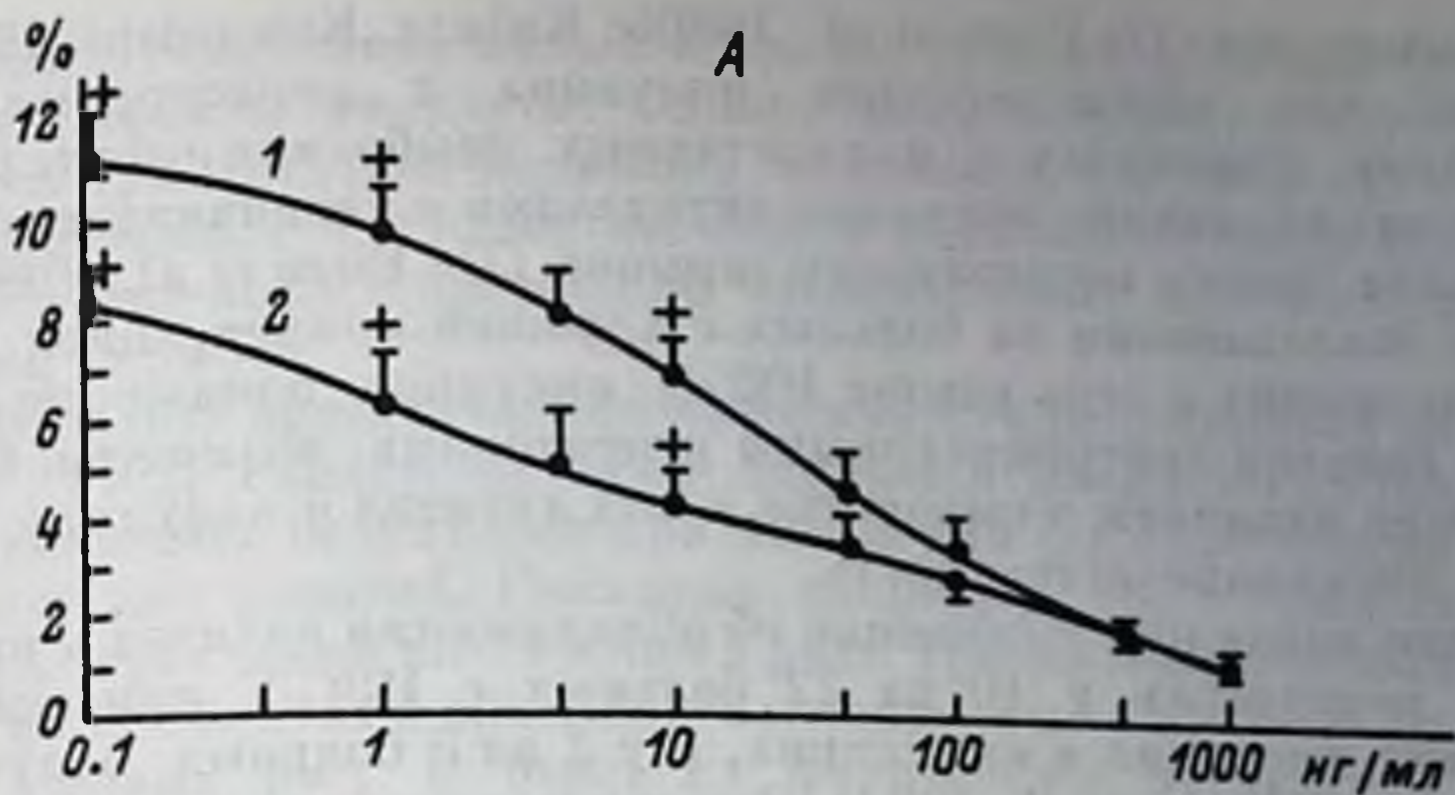


Рис. 2. Анализ инсулинрецепторных взаимодействий при беременности у женщин с сахарным диабетом.

А — кривые конкурентного вытеснения ^{125}I инсулина немеченым инсулином в разных концентрациях в эритроцитах здоровых женщин (1) и больных сахарным диабетом (2). По оси абсцисс: логарифм концентрации немеченого инсулина, нг/мл; по оси ординат: специфическое связывание ^{125}I инсулина, % к общему инсулину в расчете на 3.6×10^9 клеток/мл. Статистически достоверно отличающиеся значения обозначены знаком «плюс». Б — те же данные в координатах графика Скэтчарда. По оси абсцисс: связанный инсулин, нг/мл в расчете на 3.6×10^9 кл/мл; по оси ординат: отношение ^{125}I инсулина связанного к свободному.

антитела к инсулину и антитела к инсулиновым рецепторам. ИЗСД является в значительной степени аутоиммунным заболеванием и характеризуется образованием большого количества антител к островковым клеткам, титр которых снижается со временем по мере исчезновения В-клеток. Больные с этим заболеванием постоянно лечатся инсулином, что также приводит к образованию специфических антител. Эти антитела связывают инсулин, тем самым понижая в циркуляции уровень свободного гормона.

Из многочисленных работ известно, что наличие в сыворотке антител к инсулину приводит к более низкому связыванию его тка-

невыми клетками (De Pigo et al., 1980b; Kubota, Kawanishi, 1981). Показано, что взаимодействие инсулина с рецепторами на эритроцитах, моноцитах и плацентарных мембранах отсутствует при полном связывании инсулина антителами и увеличивается при возрастании уровня несвязанного гормона (De Pigo et al., 1980b). В нашем исследовании на больных с хорошей компенсацией диабета, получавших в день свыше 100 ед. инсулина, понижение связывания гормона эритроцитарными рецепторами, возможно, было обусловлено наличием в сыворотке у них антител к инсулину, вызвавших инсулинрезистентность.

Недавно появилось сообщение об обнаружении антител к инсулиновым рецепторам у 10 из 22 больных с ИЗСД, никогда не получавших инсулина в инъекциях, и у 2 из 5 больных, получавших инсулин (Magon et al., 1983). Эти данные позволяют предположить, что аутоиммунитет к инсулиновым рецепторам может способствовать развитию патофизиологических процессов при ИЗСД.

К негормональным антагонистам инсулина, помимо антител, относятся также кетоновые тела, свободные жирные кислоты, которые накапливаются в крови у больных с плохо коррегированным сахарным диабетом. При этом может возникнуть состояние кетоацидоза с изменением pH крови. Максимальное связывание инсулина рецепторами на всех тканевых клетках наблюдается при pH 7.8—8.0. При клинически выраженном кетоацидозе pH изменяется от 7.4 до 6.8, а связывание инсулина рецепторами падает более чем на 50 % за счет снижения количества и сродства рецепторов к инсулину (Misbin et al., 1978; Whittaker et al., 1981). В результате резко возрастает резистентность к инсулину, а для выведения больного из состояния кетоацидоза требуются дозы гормонов, в несколько раз превышающие ежедневную терапевтическую дозу. Наряду с инсулинотерапией таким больным необходимо введение в кровь растворов, нормализующих pH .

На основании приведенных литературных данных можно заключить, что при ИЗСД имеется инсулинрезистентность и она может быть обусловлена нарушениями на пререцепторном уровне или / и на уровне инсулиновых рецепторов в клетках. Во многих работах констатируется сниженный уровень инсулинрецепторного взаимодействия и отмечена корреляция его с пониженной чувствительностью к инсулину со стороны некоторых инсулинзависимых метаболических процессов в клетках и в организме.

Инсулинрезистентность при ИЗСД может быть вызвана нарушениями и на пострецепторном уровне, что проявляется снижением метаболического ответа на максимально эффективную дозу гормона у больных с некомпенсированным сахарным диабетом при наличии пролонгированной гипергликемии. Пострецепторные звенья в механизме действия инсулина пока еще мало изучены, и трудно определить, где локализуется этот дефект: на стадии формирования трансмембранного сигнала, генерации внутриклеточных мессенджеров или изменения в активности транспортных

систем и внутриклеточных энзимов, результирующих биологические эффекты инсулина. Однако инсулинрезистентность любого генеза при ИЗСД, по-видимому, вторична к основной причине этого заболевания, т. е. к недостаточности эндогенного инсулина и дисбалансу инсулина в организме, возникающему при экзогенном введении гормона.

В пользу представления о вторичности рецепторных нарушений при ИЗСД свидетельствуют данные о лабильности параметров инсулиновых рецепторов при изменении физиологических и патологических условий. Показано, например, что у больных с ИЗСД существует такой же суточный ритм уровня инсулиновых рецепторов на моноцитах и эритроцитах, связанный с приемом пищи, как и у здоровых лиц. В ответ на физическую нагрузку у больных с ИЗСД, как и у здоровых, отмечается значительное повышение связывания инсулина рецепторами на клетках крови (Pedersen, 1984). У больных с нелеченым ИЗСД, характеризующимся резкой инсулинпенией, емкость инсулиновых рецепторов для инсулина повышается. По-видимому, применение высокоочищенного, близкого по структуре к человеческому инсулина и соответствующее потребностям введение его (с помощью биостатора) могло бы восстанавливать как инсулинрецепторное взаимодействие, так и обусловленный в значительной мере этим процессом обмен веществ в организме.

ТИП II, ИНСУЛИННЕЗАВИСИМЫЙ САХАРНЫЙ ДИАБЕТ (ИНСД)

Этот тип заболевания встречается у большинства больных с сахарным диабетом. Заболевание начинается обычно в зрелом возрасте, очень часто сочетается с ожирением, не имеет склонности к кетозу, и, как правило, для лечения не требует инсулина, поскольку диабетические нарушения обычно могут компенсироваться диетой и негормональными препаратами. Главной особенностью этого типа сахарного диабета является отсутствие явно выраженной недостаточности инсулина (особенно при начальных и легких формах). Однако при нем снижена чувствительность тканей к инсулину, что в значительной мере определяет свойственные диабету метаболические нарушения.

Предположение о таком типе сахарного диабета возникло давно. В 1932 г. В. Г. Баранов на основании реакции больных на инсулинтерапию высказался в пользу наличия у некоторых из них не абсолютной, а относительной инсулиновой недостаточности. Позже это подтвердилось данными о высоком содержании инсулина в крови у части больных с сахарным диабетом (Yallow, Berson, 1960). При этом было сделано заключение, что сахарный диабет у пациентов с высоким содержанием инсулина в крови, по-видимому, связан с повышением резистентности тканей к инсулину, что дало толчок большому количеству исследований чувствительности к инсулину как организма в целом, так и тканей и клеток.

Была использована удобная методика для регистрации чувствительности к инсулину. У испытуемых на фоне постоянной инфузии инсулина и глюкозы каждые 10 мин определяли их уровни в крови. При этом выявилось значительное снижение утилизации глюкозы у больных сахарным диабетом при том же уровне инсулина в циркуляции, что и у здоровых (Ginsberg et al., 1975). Затем это подтвердили другие авторы в аналогичных исследованиях, показав, что степень инсулинрезистентности коррелирует с тяжестью диабета (Harano et al., 1978; De Fronzo et al., 1979).

В изучении на биопсированной жировой ткани больных с ИНСД метаболизм ^{14}C -глюкозы под влиянием инсулина также оказался сниженным (Ярошевский, 1977; Schulz et al., 1979).

Чтобы вскрыть механизмы ослабленной чувствительности периферических тканей к инсулину в последние годы было предпринято более обстоятельное изучение тканей-мишеней. Это позволило сформулировать понятие инсулинрезистентности, классифицировать ее и попытаться определить локализацию дефекта, ответственного за инсулинрезистентность (Kahn, 1980; Olefsky, 1981).

Резистентность, как показано, может быть обусловлена тремя причинами: 1) аномалией секреторного продукта В-клеток, 2) наличием повышенного количества антагонистов, 3) дефектом в тканях-мишенях относительно к действию инсулина. О первых двух причинах говорилось при рассмотрении ИЗСД.

Действие инсулина на ткани проявляется целым рядом разнообразных физико-химических и биологических реакций, обуславливающих свойственный инсулину характер метаболизма. Первично инсулин взаимодействует со специфическими рецепторами на поверхности клеточной мембраны. Состояние инсулиновых рецепторов, а именно количественное содержание их и сродство к гормону, определяет чувствительность данной клетки и соответствующей ткани к инсулину. Известно, что для максимального биологического эффекта инсулина в большинстве инсулинзависимых тканей достаточно занятости его молекулами не всех, а только 5—10 % клеточных рецепторов. При резкой гипоинсулинемии максимальное биологическое действие не достигается, так как не оккупировано 10 % рецепторов.

Это может иметь место при тяжелом ИЗСД. Если же резко снижено количество рецепторов (их меньше 10 %), то увеличивается концентрация гормона, и для способности инсулина генерировать максимальный биологический ответ должно быть оккупировано большее число рецепторов.

В экспериментах убедительно продемонстрирована зависимость процесса окисления ^{14}C -глюкозы в жировых клетках от количества рецепторов на мембранах. Рецепторы на адипоцитах обрабатывались возрастающими дозами трипсина *in vitro*, что блокировало действие на них инсулина. При этом отмечено, что максимальный эффект инсулина на окисление ^{14}C -глюкозы в жировой клетке сохранялся до тех пор, пока уровень оставшихся рецепторов превышал 10 %, но резко падал, когда количество их становилось

меньше. Однако чувствительность процесса окисления глюкозы под влиянием инсулина прогрессивно понижалась по мере использования возрастающих доз трипсина, что зависело от уменьшения емкости рецепторов. Чувствительность обычно определяют как концентрацию гормона, вызывающую $1/2$ максимального биологического ответа; чем меньше эта доза, тем чувствительность выше, и наоборот, при низкой чувствительности требуются большие дозы инсулина (Kahn, 1980). Графическое изображение кривых доза-ответ представлено на рис. 3.

На основании таких кривых пытаются в настоящее время с некоторой вероятностью определить локализацию дефекта, ответственного за нарушение биологического действия инсулина. Так, если кривая смещена вправо, т. е. характерна для снижения чувствительности процесса к пороговой в норме дозе инсулина, но ответ на максимально эффективную дозу инсулина не изменен, то это предполагает, что дефект локализуется на рецепторном уровне и обусловлен снижением количества или/и сродства инсулиновых рецепторов. Если же наряду с правосторонним смещением кривая идет на более низком уровне, т. е. показывает пропорциональное понижение действия инсулина при всех его концентрациях, включая максимально эффективную, это указывает на комбинированный дефект с нарушением как чувствительности клетки к гормону, так и ее способности отвечать на него. Полагают, что такая зависимость бывает при нарушениях не только на рецепторном, но и на пострецепторном уровнях.

У больных с ИНСД хорошо изучен характер связывания инсулина специфическими рецепторами на многих видах клеток. Впервые исследователи на лимфоцитах, а затем на моноцитах показали, что у больных с явным ИНСД и у большинства больных с нарушением толерантности к глюкозе снижена чувствительность рецепторов к инсулину. У них на низком уровне оказалось связывание инсулина, количество и сродство рецепторов на изученных клетках, причем эти характеристики были получены и у больных без сопутствующего ожирения (Olefsky, Reaven, 1974, 1977). Авторы вы-

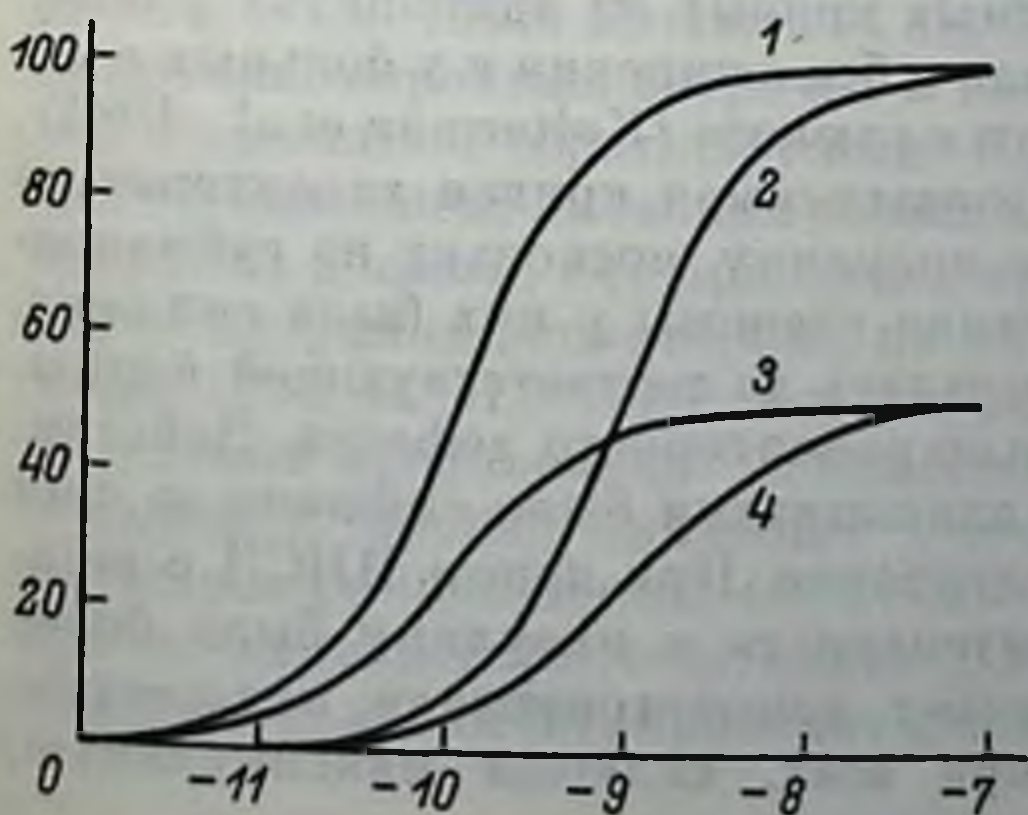


Рис. 3. Типы резистентности к инсулину (по: Kahn, 1980).

По оси абсцисс: логарифм концентрации инсулина; по оси ординат: биологический ответ на инсулин. 1 — нормальный биологический ответ, 2 — снижена чувствительность к инсулину, 3 — снижен максимальный биологический ответ на инсулин, 4 — снижены чувствительность к инсулину и максимальный биологический ответ на инсулин.

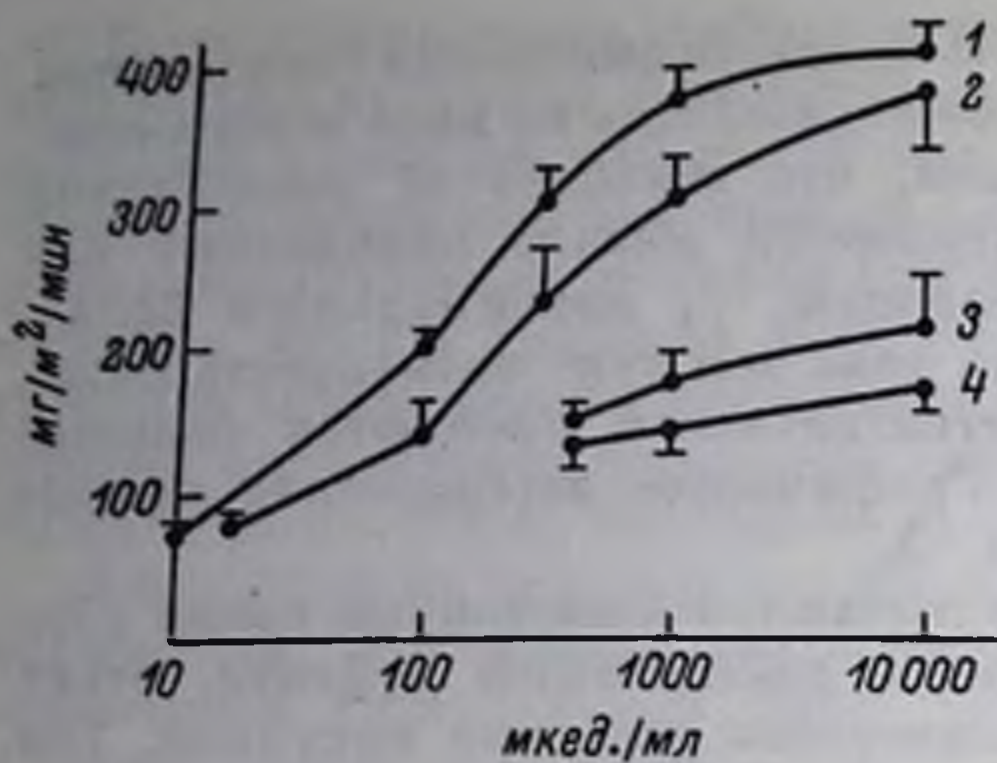


Рис. 4. Биологическая эффективность инсулина при инсулин-независимом сахарном диабете (по: Kolterman, 1981).

По оси абсцисс: логарифм концентрации инсулина в крови, мкед./мл; по оси ординат: скорость поглощения глюкозы, мг на 1 м² поверхности тела в минуту, 1 — дозозависимые кривые у здоровых лиц, 2 — у больных с нарушенной толерантностью к глюкозе, 3 — у больных сахарным диабетом без ожирения, 4 — у больных сахарным диабетом с ожирением.

явили прямую корреляцию между уровнем рецепторного связывания инсулина и чувствительностью больных к экзогенному гормону, а также обратную корреляцию между указанными процессами и содержанием инсулина в крови, которое у большинства больных было повышено. Однако все же у части больных со значительной гипергликемией натошак резистентность к инсулину и низкий уровень его связывания сочетались с нормальной или даже пониженной инсулинемией. Полагают, что последнее являлось результатом угнетающего действия длительной гипергликемии на секрецию инсулина В-клетками (Savage et al., 1979; Reaven, 1980). Лечение таких больных повышает уровень инсулина в крови, но связывание его рецепторами до конца не нормализует (Reaven, 1980). Высказано мнение, что это указывает на первичность рецепторного дефекта по сравнению с преходящей недостаточностью секреции инсулина у больных с ИНСД.

Нарушение инсулинорецепторного взаимодействия, обусловленное уменьшением количества рецепторов к инсулину, было продемонстрировано у больных с ИНСД на жировых клетках, эритроцитах, нейтрофилах, Т-лимфоцитах. В некоторых работах изучалась корреляция характера связывания инсулина клеточными рецепторами с интенсивностью метаболизма глюкозы в клетке или на уровне организма. Эта корреляция наглядно была продемонстрирована при изучении дозозависимых кривых на адипоцитах у больных ИНСД как с ожирением, так и без ожирения и у больных с нарушенной пробой толерантности к глюкозе (Kolterman et al., 1981). Оказалось, что у последних дозозависимая кривая характеризует нарушение чувствительности к инсулину, поскольку на субмаксимальные дозы гормона утилизация глюкозы у них была снижена, а на максимальную дозу повышалась до соответствующей нормы. Это указывало на наличие только рецепторного дефекта. Действительно, связывание инсулина адипоцитами было снижено за счет уменьшения концентрации рецепторов. При явном ИНСД с ожирением и без ожирения резистентность к инсулину была более выраженной, а кривые доза-ответ демонстрировали недостаточность утилизации глюкозы при всех, включая максимальную,

концентрациях инсулина в циркуляции. Таким образом, это свидетельствовало и о рецепторном, и о пострецепторном нарушениях (рис. 4). Причем было показано, что выраженность пострецепторного дефекта возрастает в прямой зависимости от интенсивности гипергликемии и становится доминирующим нарушением.

В указанной работе, помимо утилизации глюкозы в организме, исследовалось блокирующее влияние различных концентраций инсулина в циркуляции на выделение печенью ^{14}C -глюкозы. Этот эффект был ослаблен у больных с ИНСД только при наиболее низкой дозе инсулина, но при более высоких его количествах выход глюкозы из печени блокировался, что указывало только на рецепторный уровень локализации данного нарушения. В базальных условиях продукция глюкозы из печени у больных была выше, чем у здоровых, причем уровень ее прямо коррелировал с тяжестью диабета. Повышенная продукция глюкозы из печени у больных с ИНСД, наряду с резистентностью периферических тканей (мышечной, жировой) к инсулину, играет большую роль в повышении уровня гликемии.

Четких различий по всем изученным параметрам у больных с ИНСД с ожирением и без ожирения получено не было. Только при наличии у больного гипергликемии избыточная масса его тела как бы усугубляла проявление пострецепторного дефекта. Эти данные подчеркивают независимость инсулинрезистентности у больных с ИНСД от ожирения, которое часто ему сопутствует.

Как известно, ожирение само по себе характеризуется недостаточной чувствительностью периферических тканей к инсулину и выраженной гиперинсулинемией натощак и после нагрузки глюкозой. Благодаря этому уровень глюкозы в крови у лиц с ожирением сохраняется в пределах нормы даже после приема глюкозы. При всех формах ожирения — экспериментального у животных и спонтанного у людей — было обнаружено снижение специфического связывания инсулина клеточными рецепторами, что обуславливалось понижением количества рецепторов. Это было продемонстрировано на печеночных, жировых, мышечных и кровяных клетках. Отмечена также четкая корреляция между степенью инсулинрезистентности, выраженностью инсулин-рецепторного дефекта, с одной стороны, и содержанием инсулина в крови, с другой (Beck-Nielsen et al., 1976; Harrison et al., 1976). Рецепторный дефект при ожирении, вероятно, вторичен к гиперинсулинемии, т. е. обусловлен механизмом обратной связи. Примечательно, что у некоторых лиц с ожирением, имеющих нормальный, а не повышенный уровень инсулина в крови, нет признаков инсулинрезистентности и связывание инсулина рецепторами на моноцитах и адипоцитах не снижено (Bar et al., 1976; Kolterman et al., 1980). Этот характер регуляции предохраняет от гипогликемии лиц с высоким уровнем гормона в крови. Снижение содержания инсулина, вызванное низкокалорийной диетой (Bar et al., 1976; Beck-Nielsen et al., 1976) или введением стрептозотоцина (Olefsky et al., 1976), диазоксидом (Wigand et al., 1979), приводит к повышению связывания инсулина

рецепторами, к увеличению их количества, что отмечается даже в тех случаях, когда ожирение полностью не ликвидируется. Инсулинрезистентность, присущая ожирению, является гетерогенным нарушением, локализованным или на рецепторном или — при значительной гиперинсулинемии — и на пострецепторном уровне (Olefsky, 1981). Имеются доказательства того, что резкая гиперинсулинемия не только регулирует рецепторы инсулина, но и вызывает пострецепторную резистентность к гормону (Martin et al., 1983).

Характер диеты сам по себе оказывает значительное влияние на инсулинрецепторное взаимодействие и на формирование инсулинрезистентности. В частности, высокоуглеводная и высокожировая диета значительно снижают связывание инсулина специфическими клеточными рецепторами и понижают обменные процессы в клетке (Rizkalla et al., 1981; Grundleyer, Thenen, 1982).

Очень сложным является вопрос о наличии связи между ожирением и ИНСД. Ожирение не всегда приводит к возникновению сахарного диабета, нет четкой корреляции между степенью ожирения и степенью тяжести сахарного диабета. И то, и другое заболевание характеризуется инсулинрезистентностью, которая может быть локализована на рецепторном или/и пострецепторном уровнях; они имеют сходные нарушения метаболических процессов, в результате которых повышаются липемия, содержание триглицеридов, холестерина, СЖК в крови и т. д. Ожирение предрасполагает к развитию ИНСД, возможно, по следующей схеме: переизбыток → гиперинсулинизм → понижение количества рецепторов → понижение чувствительности к инсулину → гипергликемия. Пострецепторные дефекты могут наблюдаться при наличии выраженной гиперинсулинемии с пролонгированным ожирением или при значительной гипергликемии (Pedersen, 1984).

Некоторые отличия при ожирении и ИНСД имеются на уровне секреции инсулина в ответ на нагрузку глюкозой. У лиц с ожирением при этом возникает резкая гиперинсулинемия. При сочетании ожирения с ИНСД инсулинемия близка к нормальной, а при ИНСД без ожирения отмечается гипоинсулинемия, степень которой прямо зависит от выраженности гипергликемии натощак (Perley, Kipnis, 1966; Reaven et al., 1976).

Кроме того, у больных сахарным диабетом даже с начальными стадиями его (предиабетом и «химическим» диабетом) отмечается качественное нарушение секреции инсулина, а именно запоздалый подъем ее на нагрузку глюкозой и количественная недостаточность, определяемая по отношению суммарного за пробу на толерантность к глюкозе содержания инсулина в крови к суммарному уровню гликемии (Seltzer et al., 1967; Баранов и др., 1980). Дефицит инсулина выявляется у больных с ИНСД без ожирения при пробах со стимуляцией секреции инсулина (Karam et al., 1980; Moinade et al., 1982). Эти данные как бы указывают на то, что ИНСД начинается у лиц с ожирением, у которых поджелудочная железа не способна долго поддерживать повышенный уровень инсулина в крови. Сна-

чала у них констатируется легкое качественное нарушение секреции инсулина из-за недостаточности резерва его в В-клетках, затем оно прогрессирует и приводит к постоянной абсолютной инсулиновой недостаточности, что коррелирует с нарастанием тяжести сахарного диабета. Некоторые авторы считают, что этот фактор более значим в патогенезе сахарного диабета II типа, чем рецепторный дефект (Seltzer, 1982).

С такой точкой зрения созвучны результаты, полученные в последнее время (Taylon, Blackard, 1982). У больных с ожирением и легкой степенью ИНСД, имевших низкий уровень инсулинрецепторного связывания на моноцитах, исходная высокая инсулинемия была снижена лечением их диазоксидом, угнетающим секрецию инсулина. При этом связывание инсулина рецепторами возросло, но значительно возросла и гликемия. У больных же с более тяжелым ИНСД и ожирением, с пониженным или нормальным уровнем исходной инсулинемии лечение диазоксидом пришлось прервать в первые же дни из-за ухудшения состояния больных (гликемия превысила 350 мг% и возник кетоацидоз), хотя связывание инсулина моноцитами у них было повышенным.

В последние годы активно изучается динамика инсулинрецепторного взаимодействия у больных с ИНСД на фоне лечения. Известно, что диета с низким содержанием углеводов и жиров уже после 10 дней применения способствует повышению связывания инсулина рецепторами на моноцитах. Более длительное применение диеты приводит к нормализации этого процесса, к понижению до нормы уровня инсулина натощак и к возрастанию его секреции на глюкозу, к нормализации чувствительности больных к инсулину и уровня глюкозы в крови (Beck-Nielsen et al., 1979, 1980; Savage et al., 1979). Сочетание диетического лечения с применением глибенкламида (препарата сульфанилмочевины) особенно эффективно. Возрастание уровня связывания инсулина специфическими рецепторами на моноцитах, сочетавшееся с повышением у больных толерантности к глюкозе, отмечено было при лечении и другими препаратами сульфанилмочевины (Olefsky, Reaven, 1976; Dalimunthe, 1980; Greenfield et al., 1982). Но применение глибурида не дало рецепторного эффекта (Kolterman et al., 1983). В исследованиях *in vitro* с предварительной инкубацией тканевых клеток в среде с добавлением различных препаратов сульфанилмочевины и последующим изучением на этих клетках рецепторного связывания инсулина не выявлено влияния их на данный процесс (Vigneri et al., 1982). По-видимому, препараты сульфанилмочевины могут оказывать опосредованное влияние на рецепторы, регулируя секрецию инсулина и содержание его в крови.

В указанном исследовании *in vitro* препараты бигуанидов (фенформин и метформин), наоборот, значительно повысили инсулинсвязывающую активность клеток, преимущественно за счет возрастания сродства рецепторов к инсулину (Vigneri et al., 1982). В клинических исследованиях эффект бигуанидов на рецепторном уровне был также подтвержден, причем отмечалось их влияние и на увели-

чение количества рецепторов в клетках, хотя содержание инсулина в крови при этих условиях оставалось неизменным (Lord et al., 1983). У больных с ИНСД неслучайно наиболее эффективным оказывается комбинированное лечение препаратами сульфаниламочевина и бигуанидов, которые, с одной стороны, корректируют секрецию инсулина, а с другой стороны, повышают чувствительность тканей к инсулину. Это может приводить к нормализации диабетических нарушений метаболизма.

Интенсивная физическая нагрузка (физические упражнения, работа на велоэргометре) также повышает у больных с ИНСД и ожирением уровень рецепторного связывания инсулина (Soman et al., 1979; Vranic, Berger, 1979). Это коррелирует с повышением чувствительности к инсулину и активацией метаболизма глюкозы (Koivisto, 1984).

Исходя из представленных данных, можно заключить, что специфические инсулиновые рецепторы на изученных клетках у больных с ИНСД являются очень лабильными и изменяются в зависимости от уровня инсулина в циркуляции, а также под влиянием диеты, препаратов сульфаниламочевина и бигуанидов и физической нагрузки. Это свидетельствует в пользу того, что регуляция их значительно не нарушена, особенно со стороны инсулина.

Надо отметить, что не все авторы нашли сниженный уровень инсулинрецепторного взаимодействия и уменьшение количества инсулиновых рецепторов у больных с ИНСД (Bolinder et al., 1982; Lönnroth et al., 1983). В ряде исследований было показано, что имеется обратная корреляция между емкостью инсулиновых рецепторов для гормона и уровнем инсулинемии в ответ на глюкозу. При этом могут быть выделены больные с повышенным, нормальным и низким связыванием инсулина. Уровень гипергликемии у них тем выше, чем меньше содержание инсулина в крови (Okamoto et al., 1981; Talyon, Blackard, 1982). Эта корреляция прослеживается более четко, чем корреляция уровня гликемии с уровнем рецепторного связывания инсулина и со степенью снижения количества рецепторов на клетках.

Итак, резистентность к инсулину при ИНСД обусловлена как рецепторным, так и пострецепторным дефектами. В настоящее время биохимические процессы на пострецепторном уровне мало изучены. Есть предположение, что этот дефект обусловлен гуморальными и, возможно, генетической природы факторами, угнетающими внутриклеточные ферменты глюкозного метаболизма (Dean et al., 1984). Однако в ряде исследований показано, что пострецепторный дефект, степень которого высоко коррелирует с уровнем гипергликемии, характеризуется изменчивостью и может быть в значительной степени устранен при лечении больных инсулином с достижением нормогликемии (Kolterman et al., 1981; Scarlett et al., 1983). При этом повышается транспорт и метаболизм глюкозы в клетках. Таким образом, пострецепторные дефекты оказываются зависимыми от недостаточности инсулина, как это имеет место и при ИЗСД.

НАРУШЕНИЕ ТОЛЕРАНТНОСТИ К ГЛЮКОЗЕ

В последние годы показано, что больные, характеризующиеся нормальным уровнем гликемии натощак, но нарушенной толерантностью к глюкозе, делятся на две гетерогенные группы (Reaven, 1980; Schulz et al., 1980). В первую группу, меньшую по количеству, входят лица с нормальной массой тела. Они характеризуются нормальной или повышенной инсулинемией натощак, но в ответ на нагрузку глюкозой инсулинемия у них оказывается в пределах нормы или снижена. У этих больных чувствительность к инсулину не нарушена, так же как и рецепторное связывание его. Вторая группа, в которую входят в основном больные с сопутствующим ожирением, характеризуется гиперинсулинемией как натощак, так и после нагрузки глюкозой, сниженной чувствительностью тканей к инсулину и сниженным уровнем инсулинрецепторной активности.

У больных с нарушением толерантности к глюкозе при неблагоприятных условиях может развиваться явный сахарный диабет, по-видимому, в первой группе — инсулинзависимый, а во второй — инсулиннезависимый. При лечении диетой и противодиабетическими препаратами нарушение толерантности к глюкозе может нормализоваться. Последнее в наибольшей степени касается больных с сопутствующим ожирением. При этом у них повышается связывание инсулина с рецепторами, но снижается уровень исходной гиперинсулинемии до нормального (Olefsky, Reaven, 1976; Beck-Nielsen et al., 1979). Приведенные данные подчеркивают вторичность в изменении инсулин-рецепторного взаимодействия к изменению уровня инсулина в крови.

Таким образом, спонтанный сахарный диабет I типа (ИЗСД) обусловлен первичной недостаточностью инсулярного аппарата поджелудочной железы. Чувствительность к инсулину у больных снижается по мере нарастания пролонгированной гипергликемии. Эта инсулинрезистентность, так же как и снижение инсулин-рецепторной активности, вторична к дефициту инсулина и является показателем недостаточной коррекции диабетических нарушений экзогенным инсулином.

При сахарном диабете II типа (ИНСД) имеется комбинация недостаточной чувствительности тканей к инсулину и инсулиновой недостаточности. Последняя первично является относительной и характеризуется повышенным уровнем инсулина, но пониженным его эффектом. По мере истощения компенсаторных возможностей В-клеток инсулиновая недостаточность может стать абсолютной. Современные данные показывают большое значение рецепторов к инсулину в патогенезе сахарного диабета, объясняют многие особенности его течения и эффекты терапии.

СИНДРОМЫ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ ИНСУЛИНРЕЗИСТЕНТНОСТИ

В 1975 г. появилось сообщение об исследовании 6 больных с резко выраженной инсулинрезистентностью, сахарным диабетом и *acanthosis nigricans*. Уровень инсулина в крови у больных превышал пределы нормы в 10—100 раз и натошак, и после приема глюкозы, а дозы инсулина, необходимые для коррекции диабета, составляли тысячи единиц в сутки (Flier et al., 1975). У всех пациентов было резко снижено связывание инсулина рецепторами на моноцитах, причем сыворотка крови от трех из них блокировала связывание инсулина рецепторами моноцитов от здоровых лиц. В этих сыворотках были обнаружены антитела к инсулиновым рецепторам, и тем самым было доказано, что антитела могут изменять инсулиновый рецептор, ухудшать связывание инсулина и вызывать клинический синдром инсулинрезистентности. В последующие годы были получены новые данные о генезе инсулинрезистентности при подобных, очень редко встречающихся синдромах.

Больные с *acanthosis nigricans* разделяются на три типа: А, В и С. Тип А описан у молодых женщин с ожирением, вирилизацией и поликистозом яичников. Эти больные не имеют признаков аутоиммунных нарушений, и в крови у них не обнаруживаются антитела к инсулиновым рецепторам. Тем не менее связывание инсулина рецепторами на моноцитах и на других клетках (фибробластах кожи) значительно снижено, причем за счет уменьшения не числа, а сродства рецепторов к инсулину. Голодание этих больных на протяжении 72 ч хотя и снижало уровень инсулина в крови, но не изменяло характера связывания его с моноцитами (Muggeo et al., 1980b). Это отличает указанных больных от прочих больных с ожирением, у которых снижение гиперинсулинемии с помощью диеты и голодания коррелирует с повышением связывания инсулина. По-видимому, при данной патологии имеет место первичный генерализованный дефект структуры инсулиновых рецепторов или имеется дефект в пострецепторных зонах, который отражается на сродстве рецепторов к инсулину.

Тип В встречается у пожилых женщин с различными аутоиммунными нарушениями (нередко с системной красной волчанкой) и с антителами в крови, в том числе и с антителами к инсулиновым рецепторам. Они представлены иммуноглобулинами фракции IgG и, как оказалось, обладают инсулиноподобным действием, комплексируясь с рецептором (Van Obberghen et al., 1982). Однако инсулиноподобная активность их кратковременна, преходяща, на начальных этапах она может даже проявляться спонтанными клиническими гипогликемиями за счет того, что антитела имитируют некоторые эффекты инсулина на белковый, жировой и углеводный метаболизм. При продолжительном воздействии антител на клетки происходит потеря последними чувствительности к инсулину (Van Obberghen et al., 1982).

У больных с этим типом синдрома на жировых и кровяных клетках было показано значительное снижение инсулин-рецептор-

ного связывания за счет падения количества рецепторов, что отрицательно коррелировало со степенью инсулинрезистентности или титром рецепторных антител (Muggeo et al., 1979b). Изучение кривых доза-ответ на жировых клетках выявило понижение чувствительности к инсулину относительно транспорта, окисления глюкозы, липогенеза, а также понижение максимального ответа на инсулин при этих процессах (Pedersen et al., 1981). При этом было сделано заключение, что антитела блокируют инсулиновые рецепторы в тканях-мишенях, вызывая инсулинрезистентность и сахарный диабет через ухудшение чувствительности к инсулину на рецепторном уровне и через снижение действия инсулина на пострецепторном уровне. Клиническое течение этого заболевания вариабельно и характеризуется спонтанными ремиссиями и рецидивами (Flier et al., 1978). В случае спонтанной или вызванной глюкокортикоидами ремиссии наблюдается восстановление нормального связывания инсулина. Это свидетельствует о том, что первичной аномалии рецепторов у данных больных нет, дефекты их вторичны к ингибированию рецепторов специфическими антителами.

Тип С наблюдается у молодых женщин, имеет идентичную типу А клинику, характеризуется значительными концентрациями инсулина в крови — от 400 до 3000 мкед·мл. Инсулинрезистентность при нем резко выражена, но не всегда проявляется в форме сахарного диабета (Bar et al., 1978b). Отличительной особенностью этих больных является то, что у них связывание инсулина рецепторами на клетках не изменено, количество и сродство рецепторов к инсулину не уменьшено. По-видимому, резистентность к инсулину при этом типе обусловлена внутриклеточными факторами, действующими на пострецепторных звеньях (Bar et al., 1978a).

К синдромам экстремальной инсулинрезистентности относится целый ряд врожденных заболеваний, таких, как липодистрофический сахарный диабет, атаксия-телеангиоэктазия, лепрехаизм, мышечная дистрофия. При них отмечается компенсаторная гиперинсулинемия в крови у больных, которая может удерживать уровень гликемии в нормальных пределах. Инсулинрезистентность при этих заболеваниях гетерогенна. Например, при липодистрофическом сахарном диабете связывание инсулина рецепторами на моноцитах и эритроцитах варьирует у разных больных от высокого до низкого, антитела к инсулиновым рецепторам не обнаруживаются (Wachslicht-Rodbarg et al., 1981). Голодание приводит к понижению уровня инсулина в крови и к повышению связывания его моноцитами до нормы при исходном сниженном уровне (Oseid et al., 1977). При атаксии-телеангиоэктазии имеются нарушения в иммунной системе, инсулинрезистентность может быть обусловлена антителами к рецепторам инсулина (Bar et al., 1978a).

При большинстве синдромов экстремальной инсулинрезистентности молекулярные механизмы ее точно не установлены, по-видимому, биохимические дефекты локализуются или на уровне рецеп-

тора (изменение его структуры, блокирование его рецепторными антителами), или на ступенях, дистальных к гормональному рецептору.

ИНСУЛИНРЕЗИСТЕНТНОСТЬ И СИНДРОМ САХАРНОГО ДИАБЕТА ПРИ ДРУГИХ ГОРМОНАЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ

Из клинической практики хорошо известно, что при заболеваниях, обусловленных гиперпродукцией глюкокортикоидов (синдром Иценко—Кушинга) или гормона роста (акромегалия), прогрессивно снижается толерантность к глюкозе, что приводит к значительной частоте явного сахарного диабета. Это происходит за счет формирования и усугубления инсулинрезистентности под влиянием высокого уровня одного из гормонов, являющихся антагонистами инсулина. Компенсаторная гиперинсулинемия, констатируемая при указанных заболеваниях, на каком-то этапе оказывается недостаточной для коррекции инсулинрезистентности.

Изучение связывания инсулина специфическими рецепторами на клетках крови у больных с синдромом Иценко—Кушинга (Muggeo et al., 1983) и с акромегалией (Muggeo et al., 1979a) выявило низкий уровень этого взаимодействия за счет снижения или сродства рецепторов к инсулину (при синдроме Иценко—Кушинга), или количества рецепторов (при акромегалии). Эти данные согласуются с результатами, полученными при исследовании инсулин-рецепторного взаимодействия на клетках крови у лиц, получавших длительно или кратковременно кортизол, дексаметазон, преднизолон (De Pigo et al., 1980a; Yasuda, Kitabchi, 1980). В экспериментах на крысах было показано, что адреналэктомия или гипофизэктомия способствуют возрастанию инсулинсвязывающей способности рецепторов на жировых клетках и на печеночных мембранах, что коррелирует с активацией некоторых метаболических процессов в них (Kahn et al., 1978; Häring et al., 1980). Введение животным дексаметазона, АКТГ или гормона роста понижает связывание инсулина на 50—60 %, вызывает инсулинрезистентность и диабетические нарушения метаболизма.

Однако в исследованиях влияния указанных гормонов и их аналогов на инсулиновые рецепторы получаемые результаты не всегда однозначны. Надо иметь в виду многогранность действия их в организме, в частности то, что они повышают секрецию инсулина, стимулируют белковый синтез, изменяют кинетику развития клеток крови (на которых чаще всего изучаются рецепторы инсулина), и поэтому трактовка данных сложна. Предполагают, что изменение сродства рецепторов к инсулину под влиянием глюкокортикоидов и гормона роста возникает в результате первичного влияния этих гормонов на внутриклеточные пострецепторные процессы.

При других эндокринопатиях, сочетающихся с инсулинрезистентностью, гиперинсулинемией, нарушением толерантности

к глюкозе — при тиреотоксикозе, гиперпаратиреозе, гиперпролактинемии — также было выявлено снижение связывания инсулина рецепторами на моноцитах и эритроцитах за счет уменьшения числа рецепторов в клетках. Предполагается, что соответствующие гормоны (тироксин, трийодтиронин, пролактин, паратгормон), присутствующие в крови в высоких концентрациях, могут действовать на инсулиновые рецепторы опосредовано через метаболические процессы. Это отражается на функции инсулярного аппарата, способствует повышению секреции инсулина, возрастанию его содержания в крови. Последнее по механизму обратной связи приводит к уменьшению числа инсулиновых рецепторов на тканевых клетках и к инсулинрезистентности (Scherthaner et al., 1982).

Вопросы гормональных взаимоотношений на рецепторном уровне требуют дальнейшего изучения.

Л и т е р а т у р а

- Баранов В. Г. О функциональных и органических изменениях аппарата, регулирующего углеводный обмен при диабете. — Сов. врач. газета, 1932, № 13, с. 788.
- Баранов В. Г., Степанова Н. А., Тихонова Н. Е. Динамика секреции инсулина на пероральную нагрузку глюкозы и ее диагностическое значение. — Пробл. эндокринолог., 1980, т. 26, с. 3—8.
- Ярошевский Ю. А. Чувствительность изолированной жировой ткани к инсулину у больных ожирением с наличием или отсутствием сахарного диабета. — Пробл. эндокринолог., 1977, т. 23, с. 16—21.
- Bar R. S., Gordon P., Roth J. et al. Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients. Effect of starvation, refeeding and dieting. — *J. Clin. Invest.*, 1976, vol. 58, p. 1123—1135.
- Bar R. S., Levis W. R., Rechler M. M. et al. Extreme insulin resistance in ataxia teleangiectasia. Defect in affinity of insulin receptors. — *N. Engl. J. Med.*, 1978a, vol. 298, p. 1164—1171.
- Bar R. S., Muggeo M., Roth J. et al. Insulin resistance, acanthosis nigricans and normal insulin receptors in a young woman: evidence for a postreceptor defect. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1978b, vol. 47, p. 620—625.
- Beck-Nielsen H., Pedersen O., Bagger J. P., Sorensen N. The insulin receptor in normal and obese persons. — *Acta endocrinol.*, 1976, vol. 83, p. 565—575.
- Beck-Nielsen H., Pedersen O., Lindskov H. O. Increased insulin sensitivity and cellular insulin binding in obese diabetics following treatment with glibenclamide. — *Acta endocrinol.*, 1979, vol. 90, p. 451—462.
- Beck-Nielsen H., Pedersen O., Sorensen N. S. Effect of dietary changes on cellular insulin binding and in vivo insulin sensitivity. — *Metabolism*, 1980, vol. 29, p. 482—487.
- Bolinder J., Östman J., Arner P. Postreceptor defect causing insulin resistance in normoinsulinemic non-insulin-dependent diabetes mellitus. — *Diabetes*, 1982, vol. 31, p. 911—916.
- Dalimunthe D. A clinical study on insulin receptors of mononuclear cells in diabetes. — *Hiroshima J. Med. Sci.*, 1980, vol. 29, p. 203—218.
- Davidson M. B., Kaplan S. A. Increased insulin binding by hepatic plasma membranes from diabetic rats. — *J. Clin. Invest.*, 1977, vol. 59, p. 22—30.
- Dean B., Peluso I., Harrison L. C. A postbinding inhibitor of insulin action. Increased concentration in the plasma of non-insulin-dependent diabetic subjects. — *Diabetes*, 1984, vol. 33, p. 450—454.
- De Fronso R. A., Deibert D., Hendler R. et al. Insulin sensitivity and insulin binding to monocytes in maturity-onset diabetes. — *J. Clin. Invest.*, 1979, vol. 63, p. 939—946.

- De Fronzo R. A., Hendler S., Simonsay D.** Insulin resistance is a prominent feature of insulin-dependent diabetes. — *Diabetes*, 1981, vol. 31, p. 795—801.
- De Pirro R., Bertoli A., Fusco A. et al.** Effect of dexamethasone and cortisone on insulin receptors in normal human male. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1980a, vol. 51, p. 503—507.
- De Pirro R., Fusco A., Spallone L. et al.** Insulin antibodies prevent insulin-receptor interaction. — *Diabetologia*, 1980b, vol. 19, p. 118—122.
- Eaton R. S., Galagan R., Kaufman E. et al.** Receptor deplication in diabetes mellitus: correlation with therapy. — *Diabetes Care*, 1981, vol. 4, p. 299—304.
- Fantus G., Ryan J., Gorden P.** The insulin receptor in insulin-dependent diabetes mellitus: an in vivo and in vitro study. — *Metabolism*, 1981, vol. 30, p. 510—517.
- Flier J. S., Bar R. S., Muggeo M. et al.** The evolving clinical course of patients with insulin receptor autoantibodies: spontaneous remission or receptor proliferation with hypoglycemia. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1978, vol. 47, p. 985—993.
- Flier J. S., Kahn C. R., Roth J., Bar R. S.** Antibodies that impar insulin receptor binding in an unuseal diabetic syndrome with severe insulin resistance. — *Science*, 1975, vol. 190, N 4209, p. 63—65.
- Ginsberg H. N.** Investigation of insulin sensitivity in treated subjects with ketosis-prone diabetes mellitus. — *Diabetes*, 1977, vol. 26, p. 278—283.
- Ginsberg H. N., Brown Th. J.** Regulation of insulin receptors in erythroid cells. — *Metabolism*, 1982, vol. 31, p. 728—732.
- Ginsberg H. N., Kimmerling G., Olefsky J. M., Reaven G. M.** Demonstration of insulin resistance in untreated adult onset diabetic subjects with fasting hyperglycemia. — *J. Clin. Invest.*, 1975, vol. 55, p. 454—461.
- Gratacos J., Neufeld N., Kumar D. et al.** Monocyte insulin binding studies in normal and diabetic pregnancies. — *Amer. J. Obstet. and Gynecol.*, 1981, vol. 141, p. 611—616.
- Greenfield M. S., Doberne L., Rosental M. et al.** Effect of sulfonylurea treatment on in vivo insulin secretion and action in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. — *Diabetes*, 1982, vol. 31, p. 307—312.
- Grundleyer M. L., Thenen Sh. W.** Decreased insulin binding, glucose transport and glucose metabolism in soleus muscle of rats fed a high fat diet. — *Diabetes*, 1982, vol. 31, p. 232—237.
- Haneda M., Bergenstal R., Freidenberg G. et al.** Familiar diabetes associated with a possible structural defect in circulating insulin. — *Diabetes*, 1982, vol. 31, suppl. 11, p. 4A, abst. 13.
- Harano Y., Ohgaku S., Hidaka H. et al.** Glucose, insulin and somatostatin infusion for the determination of insulin sensitivity in vivo. — *Metabolism*, 1978, vol. 27, suppl. 1, p. 1449—1452.
- Harano Y., Ohgaku S., Kosugi K. et al.** Clinical significance of altered insulin. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1981, vol. 52, p. 982—987.
- Häring H., Calle C., Bug A. et al.** Insulin binding and insulin action in rat fat cells after adrenalectomy. — *Diabetologia*, 1980, vol. 19, p. 379—385.
- Harrison L. C., Billington T., Clark S. et al.** Decreased binding of insulin by receptor on placental membranes from diabetic mothers. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1977, vol. 44, p. 206—211.
- Harrison L. C., Martin F. I. R., Melick R. A.** Correlation between insulin receptor binding in isolated fat cells and insulin sensitivity in obese human subjects. — *J. Clin. Invest.*, 1976, vol. 58, p. 1435—1441.
- Hepp K. D., Langley J., Funcke H. J. von et al.** Increased insulin binding capacity of liver membranes from diabetic chinese hamsters. — *Nature*, 1975, vol. 258, N 5531, p. 154.
- Ivarsson S. A., Thorell J. I.** Reticulocytes and insulin binding to erythrocytes. — *Acta med. Scand.*, 1981, vol. 210, suppl. N 656, p. 23—27.
- Kahn C. R.** Role of insulin receptors in insulin-resistant states. — *Metabolism*, 1980, vol. 29, p. 455—456.
- Kahn C. R., Goldfine I. D., Neville D. M., De Meyts P.** Alterations in insulin binding induced by changes in vitro in the levels of glucocorticoides and growth hormone. — *Endocrinology*, 1978, vol. 103, p. 1054—1056.

- Kappy M. S., Plotnick L. P., Findlay J. S., Kayne R. D. Erythrocyte insulin binding in insulin-dependent diabetes mellitus: lack of relationship to duration and control of diabetes in children and adolescents. — *Pediatrics*, 1980, vol. 66, p. 385—390.
- Karam J. H., Young C. W., Burns A., Forsham P. H. Use of B-cell function and insulin sensitivity in the classification of diabetes. — *Diabetes*, 1980, vol. 29, suppl. 11, p. 45A.
- Kobayashi M., Olefsky J. M. Effects of streptozotocin-induced diabetes on insulin binding, glucose transport and intracellular glucose metabolism in isolated rat adipocytes. — *Diabetes*, 1979, vol. 28, p. 87—95.
- Koivisto V. A., De Fronzo R. A. Exercise in the treatment of type II diabetes. — *Acta endocrinol.*, 1984, vol. 105, suppl. 262, p. 107—111.
- Kolterman O. G., Grau R. S., Griffin J. et al. Receptor and postreceptor defects contribute to the insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus. — *J. Clin. Invest.*, 1981, vol. 68, p. 957—969.
- Kolterman O. G., Insel Y., Saecow M., Olefsky J. M. Mechanism of insulin-resistance in human obesity. Evidence for receptor and postreceptor defects. — *J. Clin. Invest.*, 1980, vol. 65, p. 1272—1284.
- Kolterman O. G., Prince M. J., Olefsky J. M. Insulin resistance in noninsulin-dependent diabetes mellitus: impact of sulfonylurea agents in vivo and in vitro. — *Amer. J. Med.*, 1983, vol. 74, N 1A, p. 82—101.
- Kubota M., Kawanishi K. Effect of insulin antibodies on insulin receptor. — *J. Jap. Diabet. Soc.*, 1981, vol. 24, p. 825—833.
- Lönroth M., Digirolamo M., Krotkiewsky M., Smith U. Insulin binding and responsiveness in fat cells from patients with reduced glucose tolerance and type II diabetes. — *Diabetes*, 1983, vol. 32, p. 748—754.
- Lord J. M., White S. I., Bailey C. J. et al. Effect of metformin on insulin receptor binding and glycaemic control in types II diabetes. — *Brit. Med. J.*, 1983, vol. 286, p. 830—831.
- Maron R., Elias D., Jongh B. M. de et al. Autoantibodies to the insulin receptor in juvenile onset insulin-dependent diabetes. — *Nature*, 1983, vol. 303, N 5920, p. 817—818.
- Martin C., Desai K. S., Steiner G. Receptor and postreceptor insulin resistance induced by in vivo hyperinsulinemia. — *Can. J. Physiol. and Pharmacol.*, 1983, vol. 61, p. 802—807.
- Misbin R. I., Pulkinen J., Lofton S. A., Merimel T. J. Ketoacidosis and the insulin receptor. — *Diabetes*, 1978, vol. 27, p. 539—542.
- Moinade S., Ruiz J. P., Lambert M. et al. Existe-t-il des critères biologiques permettant de conclure à l'insulino-dépendance dans le diabète de la maturité ? Etude de l'insulino-sécrétion après charge glucosée et du C peptide après repas-test. — *Rev. franc. endocrinol. clin. nutr. et métabol.*, 1982, vol. 23, p. 223—234.
- Muggeo M., Bar R. S., Roth J. et al. The insulin resistance of acromegaly: evidence for two alternations in the insulin receptor on circulating monocytes. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1979a, vol. 48, p. 17—25.
- Muggeo M., Del Prato S., Moghetti P. et al. Up regulation of insulin receptors in patients with pancreatogenic diabetes. — *Diabetologia*, 1980a, vol. 19, p. 301, abstr. 274.
- Muggeo M., Kahn C. R., Bar R. S., Rehler M. et al. The underlying insulin receptor in patients with antireceptor autoantibodies: demonstration of normal binding and immunological properties. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1979b, vol. 49, p. 110—119.
- Muggeo M., Kahn C. R., Gorden P., Roth I. Insulin receptors in patients with the syndromes of insulin of resistance and acanthosis nigricans. — *Diabetologia*, 1980b, vol. 18, p. 209—216.
- Muggeo M., Saviolakis G. A., Wachslight-Rodbard H., Roth J. Effects of chronic glucocorticoid excess in man on insulin binding to circulating cells: differences between endogenous and exogenous hypercorticism. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1983, vol. 56, p. 1169—1177.
- Nosadini R., Del Prato S., Tiengo A. et al. Insulin sensitivity binding and kinetics in pancreatogenic and type I diabetes. — *Diabetes*, 1981, vol. 31, p. 346—355.

- Ocamoto M., Kuzuya H., Seino Y. et al. Insulin binding to erythrocytes in diabetic patients. — *Endocrinol. Jap.* 1981, vol. 28, p. 169—173.
- Olefsky J. M. Insulin resistance and insulin action: an in vitro and in vivo perspective. — *Diabetes*, 1981, vol. 30, p. 148—162.
- Olefsky J. M., Bacon V. C., Baur S. Insulin receptors of skeletal muscle: specific insulin binding sites and demonstration of decreased numbers of sites in obese rats. — *Metabolism*, 1976, vol. 25, p. 179—191.
- Olefsky J. M., Reaven G. M. Decreased insulin binding to lymphocytes from diabetic patients. — *J. Clin. Invest.*, 1974, vol. 54, p. 1323—1328.
- Olefsky J. M., Reaven G. M. Effects of sulfonylurea therapy on insulin binding to mononuclear leucocytes of diabetic patients. — *Amer. J. Med.*, 1976, vol. 60, p. 89—95.
- Olefsky J. M., Reaven G. M. Insulin binding in diabetes. Relationships with plasma insulin level and insulin sensitivity. — *Diabetes*, 1977, vol. 26, p. 680—688.
- Oseid S., Beck-Nielsen H., Pedersen O., Soviki O. Decreased binding of insulin to its receptor in patients with congenital generalised lipodystrophy. — *N. Engl. J. Med.*, 1977, vol. 296, p. 245—248.
- Pedersen O. Studies of insulin receptor binding and insulin activation in humans. — *Dan. Med. Bull.*, 1984, vol. 31, p. 1—32.
- Pedersen O., Hjollund E., Beck-Nielsen H., Kromann H. Diabetes mellitus caused by insulin receptor blockade and impaired sensitivity to insulin. — *N. Engl. J. Med.*, 1981, vol. 304, p. 1085—1088.
- Perley M., Kipnis D. M. Plasma insulin responses to glucose and tolbutamide of normal weight and obese diabetic and nondiabetic subjects. — *Diabetes*, 1966, vol. 15, p. 867—874.
- Pernet A., Trimble E. R., Kunstshen F. et al. Insulin resistance in type I (insulin-dependent) diabetes: dependence on plasma insulin concentration. — *Diabetologia*, 1984, vol. 26, p. 255—260.
- Proietto J., Nankervis A., Aitken P. et al. Glucose utilisation in type I (insulin-dependent) diabetes: evidence for a defect not reversible by acute elevations of insulin. — *Diabetologia*, 1983, vol. 25, p. 331—335.
- Reaven G. M. Insulin independent diabetes mellitus: metabolic characteristics. — *Metabolism*, 1980, vol. 29, p. 445—454.
- Reaven G. M., Bernstein R., Davis B., Olefsky J. M. Nonketotic diabetes mellitus: insulin deficiency or insulin resistance? — *Amer. J. Med.*, 1976, vol. 60, p. 80—88.
- Rizkalla S. W., Boue J. L., Serog P., Apfelbaum M. Carbohydrate intake affects insulin binding to human erythrocytes in normal weight subjects, but not in subjects with family obesity. — *Metabolism*, 1981, vol. 30, p. 900—907.
- Savage P. J., Bennion L. J., Flock E. V. et al. Diet-induced improvement of abnormalities in insulin and glucagon secretion and insulin receptor binding in diabetes mellitus. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1979, vol. 48, p. 999—1007.
- Scarlett J. A., Kolterman O. G., Ciaraldi T. P. et al. Insulin treatment reverses the postreceptor defect in adipocytes-3-methylglucose transport in type II diabetes mellitus. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1983, vol. 56, p. 1195—1204.
- Schernthaner G., Prager R., Punzengruber C. et al. Insulin receptors in endocrinopathies with hyperinsulinemia and glucose intolerance: thyrotoxicosis, hyperparathyroidism, hyperprolactinemia and acromegaly. — *Acta endocrinol.*, 1982, vol. 99, suppl. N 246, p. 40—41.
- Schröder D., Zühlke H. Gene technology, characterisation of insulin gene and relationship to diabetes research. — *Endocrinologie*, 1982, Bd 79, S. 197—209.
- Schulz B., Knospe S., Michaelis D., Bibergeil H. Insulin responsiveness of adipose tissue from normal weight subjects with early diabetes. — *Acta diabet Lat.*, 1979, vol. 16, p. 235—242.
- Schulz B., Ratzmann K. P., Witt Sabine et al. Investigation of insulin sensitivity in early diabetes. II. Insulin resistance in asymptomatic diabetics. — *Endocrinologie*, 1980, Bd 76, S. 103—111.
- Seltzer H. S. Are insulin receptors clinically significant? — *J. Lab. and Clin. Med.*, 1982, vol. 100, p. 815—821.
- Seltzer H. S., Allen W. D., Herron A. L. et al. Insulin secretion in the response to glyce-

- mic stimulus: relations of delayed initial release to carbohydrate intolerance in mild diabetes. — *J. Clin. Invest.*, 1967, vol. 46, p. 323—335.
- Soman V., Koivisto V., Deibert D. et al. Increased insulin sensitivity and insulin binding to monocyte after physical training. — *N. Engl. J. Med.*, 1979, vol. 301, p. 1200—1204.
- Taylor A., Blackard W. G. Role of insulin receptors in obesity-related diabetes. — *Horm. Metabol. Res.*, 1982, vol. 14, p. 623—626.
- Toyoda Nagayasu. Insulin receptors of erythrocyte in normal and diabetic pregnancies. — *Folia Endocrinol. jap.*, 1983, vol. 59, p. 182—195.
- Van Obberghen E., Grunfeld C., Harrison L. C. et al. Autoantibodies to the insulin receptor and insulin-resistant diabetes. — *Hormon Res.*, 1982, vol. 16, p. 280—288.
- Vigneri R., Pezzino V., Wong K., Goldfine I. Comparison of the in vitro effect of biguanides and sulfonylureas on insulin binding to its receptors in target cells. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1982, vol. 54, p. 95—100.
- Vranic M., Berger M. Exercise and diabetes mellitus. — *Diabetes*, 1979, vol. 28, p. 147—167.
- Wachslicht-Rodbarg H., Muggeo M., Kahn C. R. et al. Heterogeneity of the insulin receptor interaction in lipotrophic diabetes. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1981, vol. 52, p. 416—425.
- Whittaker J., Cuthbert C., Hammond V., Alberti K. G. M. M. Impaired insulin binding to isolated adipocytes in experimental diabetic ketoacidosis. — *Diabetologia*, 1981, vol. 21, p. 563—568.
- Wigand P., Blackard W. G. Down regulation of insulin receptors in obese man. — *Diabetes*, 1979, vol. 28, p. 287—292.
- Yalow R. S., Berson S. A. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. — *J. Clin. Invest.*, 1960, vol. 39, p. 1157—1175.
- Yasuda K., Kitabchi A. E. Decreased insulin binding of human erythrocytes after dexamethasone or prednisolone ingestion. — *Diabetes*, 1980, vol. 29, p. 811—814.
- Zick R., Hürter P., Meyer B. et al. Binding von Insulin an Erythrozyten vor und nach Umstellung von Schweine auf biosynthetisches Humaninsulin. — *Münch. med. Wschr.*, 1983, Bd 125, Suppl. 1, S. 97—100.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно закону действующих масс, взаимодействие гормона с рецепторами в равной мере зависит как от числа гормональных молекул, так и от числа рецепторов. В целостном организме это реализуется в виде двух известных принципов, один из которых — down-regulation — имеет место при повышении содержания гормонов в крови и выражается в пропорциональном снижении числа свободных рецепторов, а второй — up-regulation — отражает увеличение числа рецепторов при сниженном уровне гормонов. Эти принципы сейчас известны практически для всех гормональных веществ и являются частным проявлением общеизвестного механизма саморегуляции. В системах с обратной связью данный механизм особенно важен, что в монографии отражено в главах 2 и 3 при описании действия стероидных гормонов на различные структуры мозга, и особенно гипофиз и гипоталамус, которые непосредственно участвуют в регуляции гормонального уровня.

По всей видимости, принцип down-regulation имеет место и при инсулиннезависимом сахарном диабете (глава 7), когда уровень инсулина в крови повышается на длительный срок. В этом случае, однако, регуляция осуществляется с включением большого числа других систем и механизмов, поэтому взаимоотношение с рецепторами становится не столь простым, как это имеет место при однократном введении гормона или его секреции в кровяное русло. В организме рецептор является лишь элементом единой системы сохранения гомеостаза, взаимодействующим с факторами внутренней среды, с биоактивными веществами, с гормонами и медиаторами. В конечном итоге длительное взаимодействие рецептора с изменившимися условиями среды может изменять не только число, но и свойства рецепторов, что выражается либо в уменьшении их сродства к гормону, либо в изменении скорости образования

и расщепления гормоно-рецепторных комплексов. По всей видимости, такие изменения могут завершиться «поломкой» рецептора, который из самонастраивающегося звена регуляции становится первопричиной эндокринных нарушений, выполняя функцию «испорченного телефона» в цепи передачи сигналов на эффекторные клетки.

И еще одно, не менее важное обстоятельство привлекает сейчас наше внимание. Оно касается изменения рецепции гормонов после их введения в организм в раннем постнатальном онтогенезе. В главе 2 это нашло отражение при описании опытов с введением крысятам гидрокортизона, уменьшившим на длительный срок число глюкокортикоидных рецепторов в гипоталамусе и в гипофизе и одновременно вызвавшим угнетение гормональной функции гипофизарно-адренокортикальной системы. Особенно длительные последствия возникают при введении крысятам-самкам андрогенных стероидных гормонов. У этих животных во взрослом состоянии оказывается нарушенным эстральный цикл или формируется бесплодие с одновременным уменьшением рецепции эстрадиола в матке, зависимым от дозы вводимого гормона.

В регуляции рецепции гормонов большую роль играют гормональные субстанции, близкие или даже далекие по структуре. Естественно при этом, что гормоны более близкой химической природы оказываются и более действенными в регуляции рецепции. По типу конкурентного связывания взаимодействуют на рецепторах прогестерон и кортикостерон, в то время как эстрогеновые рецепторы регулируются прогестероном по типу down-regulation, т. е. увеличиваются в числе. По такому же принципу регулируются кортикостероидами рецепторы инсулина, что имеет место при введении этих гормонов в организм.

Регуляторами гормональных рецепторов могут быть и медиаторы, а также вторичные клеточные посредники, которые на любом из звеньев рецепторной системы могут изменить ее работу, либо придав ей усиление, либо выключая ее полностью или частично из регуляторной цепи. Местом взаимодействия с медиаторами может стать клетка и те ее компоненты, в которых рецепторы локализируются, а может быть, и внеклеточная среда, в которой сосуществуют и взаимодействуют многие химические агенты. На этом этапе функцию регуляторов могут осуществлять и сами факторы внутренней среды, ее рН, концентрация ионов и т. д., что в большинстве своем изменяет не число, а сродство рецепторов к соответствующим гормонам.

Таким образом, уже сейчас можно считать, что рецепторному звену регуляции в такой же мере присущи сложные и многообразные свойства, как и любой регуляторной системе в целостном организме. Не претендуя на всесторонний анализ физиологии гормональной рецепции, авторы монографии пытались сформулировать свое суждение по этой современной проблеме. Мы убеждены в том, что в ближайшие годы теории, существующие сегодня в этой области исследований, будут пересмотрены и уточнены, с тем чтобы продолжить поиск истины и на основе строго научных фактов найти способы управления эндокринными процессами.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Глава 1. Рецепторы гормонов, их структура, свойства и закономерности функционирования в клетках. <i>В. Б. Розен</i>	5
Глава 2. Трансрецепторные механизмы в действии кортикостероидных гормонов. <i>В. Г. Шаляпина, Д. А. Жуков, И. А. Гарина, В. В. Ракицкая</i>	34
Глава 3. Рецепторы половых гормонов в гипоталамусе и их значение в регуляции циклической деятельности яичников. <i>В. Н. Бабичев</i>	70
Глава 4. Рецепция половых стероидов маткой. <i>Н. А. Арутюнян, О. Н. Савченко, М. М. Орлов</i>	103
Глава 5. Физиологические аспекты рецепции андрогенов. <i>А. Г. Резников</i>	140
Глава 6. Инсулиновый рецептор, его структура и организация. <i>Б. Н. Лейбуш</i>	165
Глава 7. Роль инсулиновых рецепторов в патогенезе сахарного диабета. <i>Н. Е. Тихонова</i>	202
Заключение	228

ФИЗИОЛОГИЯ ГОРМОНАЛЬНОЙ РЕЦЕПЦИИ

*Утверждено к печати
Институтом физиологии им. И. П. Павлова
Академии наук СССР*

Редактор издательства С. И. Налбандян
Художник А. Т. Пожванов
Технический редактор Н. А. Кругликова
Корректоры Г. А. Лебедева,
А. Х. Салтанова и Т. Г. Эдельман

ИБ № 21597

Сдано в набор 13.08.85. Подписано к печати
28.01.86. М-18522. Формат 60×90¹/₁₆. Бумага
офсетная № 1. Гарнитура обыкновенная. Фото-
набор. Печать офсетная. Усл. печ. л. 14.5.
Усл. кр.-отт. 14.68. Уч.-изд. л. 16.91. Тираж 1450.
Тип. зак. 736. Цена 2 р. 60 к.

Ордена Трудового Красного Знамени
издательство «Наука». Ленинградское отделение.
199034, Ленинград, В-34, Менделеевская линия, 1.

Ордена Трудового Красного Знамени
Первая типография издательства «Наука».
199034, Ленинград, В-34, 9 линия, 12.



3 р. 40 к.

ex Libris



ИЗДАТЕЛЬСТВО „НАУКА“
Ленинградское отделение