

В. А. ТКАЧУК

ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ ЭНДОКРИНОЛОГИЮ

ДОПУЩЕНО МИНИСТЕРСТВОМ ВЫСШЕГО И СРЕД-
НЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ СССР В КА-
ЧЕСТВЕ УЧЕБНОГО ПОСОБИЯ ДЛЯ СТУДЕНТОВ
БИОЛОГИЧЕСКИХ СПЕЦИАЛЬНОСТЕЙ ВУЗОВ

ИЗДАТЕЛЬСТВО
МОСКОВСКОГО
УНИВЕРСИТЕТА

1983

Ткачук А. А. Введение в молекулярную эндокринологию: Учеб. пособие. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1983. — 256 с., ил.

В пособии помимо традиционных вопросов эндокринологии (биосинтез, деградация и структура гормонов, роль эндокринной системы в поддержании гомеостаза и в адаптации организма) подробно обсуждены молекулярные механизмы действия гормонов, гормоноподобных веществ и нейромедиаторов, проблема «узнавания» гормона рецептором, пути передачи гормонального сигнала через мембрану, механизмы гормонзависимой индукции или репрессии синтеза белков, химической модификации белков при участии циклических нуклеотидов, изменения проницаемости мембран для ионов и метаболитов. Изложены также методы изучения рецепторов в клетках-мишенях, кинетика связывания гормона с рецептором, рассмотрена проблема десенсибилизации рецептора, дана характеристика ферментным каскадам, усиливающим гормональные эффекты.

Для студентов биологических и медицинских специальностей.

Библиогр. 106 назв. Ил. 90.

Рецензенты:

кафедра биохимии
Киевского государственного университета
(зав. кафедрой
проф. Н. Е. Кучеренко),
докт. биол. наук, проф. Н. А. Федоров

**ВСЕВОЛОД АРСЕНЬЕВИЧ ТКАЧУК
ВВЕДЕНИЕ В МОЛЕКУЛЯРНУЮ ЭНДОКРИНОЛОГИЮ**

Зав. редакцией Н. М. Глазкова. Редактор Э. И. Кранс. Мл. редактор Т. В. Властовская. Художник М. И. Гуров. Художественный редактор В. С. Вехтер. Технический редактор З. С. Кондрашова. Корректоры И. Л. Демин, Л. А. Кузнецова. Тематический план 1983 г. № 134. ИБ № 1491. Сдано в набор 20.01.83. Подписано к печати 26.05.83. Л-95338. Формат 84×108¹/₃₂. Бумага тип. № 3. Гарнитура литературная. Усл.-печ. л. 13,44. Уч.-изд. л. 13,75. Тираж 6500 экз. Заказ 27. Цена 60 коп. Изд. № 2121

Ордена «Знак Почета» издательство Московского университета.
103009, Москва, ул. Герцена, 5/7. Типография ордена «Знак Почета»
изд-ва МГУ. Москва, Ленинские горы

2007020000—118
Г 104—83
077(02)—83

© Издательство Московского университета, 1983 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

<i>Предисловие</i>	4
<i>Введение</i>	5
Глава 1. ОСНОВНЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТКИ	10
1.1. Взаимодействие метаболитов и кофакторов с ферментами	10
1.2. Изменение компартментализации веществ	25
1.3. Химическая модификация белков	40
1.4. Эксперсия генома	51
Глава 2. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ НЕЙРОГУМОРАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ	62
2.1. Функциональная связь между нервной и эндокринной системами	64
2.2. Регуляция образования и распада гормонов	74
2.2.1. Белково-пептидные гормоны	74
2.2.2. Стероидные гормоны	81
2.2.3. Тиреоидные гормоны	89
2.2.4. Катехоламины	94
2.2.5. Простагландины	98
2.3. Секреция и «транспорт» гормонов	102
Глава 3. РЕЦЕПЦИЯ ГОРМОНОВ	110
3.1. Структура гормонов и типы рецепторов	110
3.2. Образование и распад гормон-рецепторного комплекса	120
3.3. Проблемы выделения и идентификации рецепторов	131
3.4. Зависимость между оккупацией рецептора и биологическим эффектом гормона	144
Глава 4. ПРОВЕДЕНИЕ И УСИЛЕНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛА	160
4.1. Изменение проницаемости мембран под действием нейромедиаторов и гормонов	161
4.2. Гормонзависимое фосфорилирование белков	176
4.2.1. Циклазы	176
4.2.2. Фосфодиэстеразы	186
4.2.3. Протеинкиназы	193
4.2.4. Ферментный каскад	202
4.3. Гормонзависимая индукция и репрессия синтеза белка	207
Глава 5. РЕАЛИЗАЦИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛА В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ОТВЕТ КЛЕТОК, ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ	223
5.1. Взаимодействие разных регуляторных механизмов на уровне клетки	224
5.2. Взаимодействие разных регуляторных процессов на уровне организма	239
Заключение	254

ПРЕДИСЛОВИЕ

Учебное пособие написано по материалам лекций, которые в течение ряда лет автор читал студентам старших курсов биологического факультета МГУ и слушателям факультета повышения квалификации преподавателей вузов. В книге рассмотрены основные механизмы действия физиологически активных веществ, главным образом гормонов и нейромедиаторов, а также их агонистов и антагонистов. Читатель ознакомится с основными достижениями и проблемами молекулярной эндокринологии — новой и стремительно развивающейся науки. Ее методология, задачи и перспективы не могли быть полно освещены в рамках этой книги, поэтому в название учебного пособия вынесено слово «Введение».

Учебники по молекулярной эндокринологии еще не написаны. При подборе материала для пособия автору приходилось руководствоваться опытом чтения лекционного курса. Беседы со слушателями и прием экзаменов показали, что усвоение вопросов молекулярной эндокринологии невозможно без предварительного знакомства с регуляторными механизмами клетки, а также с основными нейроэндокринными связями в организме. Этому вопросу посвящены две первые главы. Здесь же дана классификация гормонов и нейромедиаторов по молекулярным механизмам действия, рассмотрена регуляция их синтеза и секреции. В третьей главе обсуждены механизмы рецепции гормонов и нейромедиаторов, а в четвертой — пути проведения и усиления регуляторного сигнала. В последней, пятой главе рассмотрено, как изменение компартментализации веществ, фосфорилирование или индукция-репрессия синтеза белка приводят к изменению метаболизма и функционального состояния клетки.

В данном пособии не отражены вопросы о биохимических и физиологических эффектах определенных гормонов и нейромедиаторов, о феноменологии нейрогуморальной регуляции. Этот материал достаточно полно изложен в ряде отечественных, а также переведенных на русский язык учебников и монографий. Можно рекомендовать следующие: Розен В. Б. «Основы эндокринологии» (М., Высшая школа, 1980); Ньюсхолм Э., Старт К. «Регуляции метаболизма» (М., Мир, 1977); «Биохимия гормонов и гормональной регуляции» (М., Наука, 1976); Клегр П., Клегр А. «Гормоны, клетки, организм» (М., Мир, 1971); Михельсон М. Я., Зеймаль Э. В. «Ацетилхолин» (Л., Наука, 1970).

Появление этого пособия стало возможным благодаря научному интересу, советам и поддержке академика С. Е. Северина. За все это автор выражает Сергею Евгеньевичу глубокую благодарность. Автор признателен своим коллегам, внимательно и критически прочитавшим рукопись книги, а также Е. И. Ратнер за большую помощь в подготовке данного пособия к печати.

Автор надеется, что эта книга будет полезна всем тем, кто интересуется молекулярными механизмами действия физиологически активных веществ. Замечания, касающиеся содержания книги, будут приняты с признательностью.

ВВЕДЕНИЕ

Живая клетка — это открытая система, постоянно обменивающаяся веществом и энергией с окружающей средой. Оставаясь термодинамически открытой системой, клетка стремится сохранить неизменным свой внутренний состав. В многоклеточном организме происходит специализация функций. При этом клетка приобретает способность реагировать изменением функциональной активности и метаболизма не только на факторы окружающей среды, но и на изменения, происходящие в других клетках организма.

В любой момент жизни в клетке происходит множество разнообразных химических реакций. Все они строго согласованы между собой и по времени, и по скорости, и по месту протекания. Эта согласованность, упорядоченность всех процессов достигается благодаря существованию сложных и многообразных внутриклеточных и межклеточных механизмов регуляции.

Химические реакции в клетке протекают при участии ферментов — биологических катализаторов. Особенность катализа, осуществляемого ферментами, состоит в том, что он высокоспецифичен (соединения, близкие по структуре к субстрату, не подвергаются превращениям), завершается без образования промежуточных или побочных продуктов и превращает субстрат только по одному пути из многих возможных. Химическая реакция, катализируемая ферментом, всегда регулируется. Регулируемость ферментов, наряду с их замечательными каталитическими свойствами, представляется решающим фактором, определившим то, что практически все процессы в биологических системах протекают при участии катализаторов белковой природы.

Совершенствование регуляторных механизмов происходило параллельно с эволюцией этих важнейших биополимеров. Одновременно с появлением регуляторных участков в белке, а затем и специальных регуля-

торных субъединиц появляется регуляция отдаленными субстратами и продуктами, а также метаболитами других биохимических циклов. Таким образом на язык химической структуры переводятся сообщения о состоянии процессов в начале и конце собственной метаболической цепи, а также об активности других циклов, важных для данной цепи реакций.

Наряду с белками основными объектами, на которые направлено регуляторное воздействие, являются мембраны и нуклеиновые кислоты.

Появление многоклеточных организмов привело к необходимости получать информацию о состоянии процессов в других клетках. Так возникли гормоны и медиаторы, а вместе с ними специальные белки и полиферментные ансамбли, выполняющие функции передачи регуляторных сигналов от клетки к клетке. Гормоны и медиаторы не принимают непосредственного участия в метаболических процессах. Они несут лишь регуляторную функцию, поэтому их именуют специфическими регуляторами. Изучением роли и механизмов действия специфических регуляторов занимается область биологической науки, получившая название «молекулярная эндокринология».

Концентрация разных метаболитов и кофакторов в клетке составляет 10^{-5} — 10^{-3} М. В диапазоне этих концентраций они осуществляют и свое регуляторное действие. Специфические регуляторы синтезируются в малых количествах. Их концентрация в крови или тканях равна 10^{-11} — 10^{-8} М. Для того чтобы вещество могло влиять на функциональную и метаболическую активность клетки при столь низких концентрациях, в процессе эволюции появились специальные регуляторные механизмы, которые позволяют значительно усиливать регуляторный сигнал.

Вещества, которые участвуют в нейрогуморальной регуляции, имеют разную природу: это производные аминокислот, пептиды, полипептиды, белки, липиды, эфиры и т. д. Те из них, которые секретируются в межклеточное пространство, проникают в кровь или лимфу, а затем попадают на клетки-мишени, мы будем называть гормонами. Те вещества, которые секретируются из пресинаптической мембраны в синаптическую щель и вызывают биологический эффект, связываясь с рецепторами постсинаптической мембраны, будем назы-

вать нейромедиаторами. Согласно такой классификации нейромедиатор, диффундируя из синаптической щели в межклеточное пространство, а оттуда в кровь и лимфу, становится гормоном. Как мы увидим позже, после перехода из синапса в кровь вещество действительно может утрачивать одни и приобретать другие регуляторные функции.

Термин «гормон» произошел от греческого слова, означающего «двигаю», «возбуждаю». Отнюдь не все вещества, которые мы будем называть гормонами, оказывают на клетки возбуждающее действие. Точно так же и нейромедиаторы могут быть как возбуждающими, так и тормозными. Подразделение специфических регуляторов на гормоны и нейромедиаторы удобно тем, что оно отражает два принципиально разных механизма действия на клетку — внесинаптический и синаптический.

Традиционно специфические регуляторы классифицируют по эндокринным железам, в которых они образуются. Год от года делать это становится все более трудно. Так, например, соматостатин, считавшийся типичным гормоном гипоталамуса, обнаружен также в поджелудочной железе, в стенках желудка и кишечника. Совсем недавно считалось, что инсулин и глюкагон синтезируются только в поджелудочной железе, а тироксин и триодтиронин — только в щитовидной железе. В последнее время показано, что помимо соматостатина в клетках кишечника образуются также инсулин, глюкагон, тироксин, триодтиронин, многие простагландины. С другой стороны, целый ряд гормонов, ранее называемых гормонами тонкого кишечника (секретин, энтерогастрон, вазоактивный интестинальный пептид и др.), обнаружен в тканях мозга.

Иногда гормоны подразделяют на истинные гормоны, гормоноиды и гуморальные факторы. Истинными гормонами называют гормоны, которые переносятся от эндокринных желез до клеток-мишеней с током крови или лимфы (АКТГ, глюкагон, инсулин и т. п.), гормоноидами — которые образуются как в эндокринных тканях, так и в нервных окончаниях (катехоламины), а гуморальными факторами — которые образуются не в специальных эндокринных железах, а во всех тканях организма (гистамин, брадикинин, простагландины и т. п.). Очевидна условность и такой классификации.

Гормоны и нейромедиаторы не всегда удается подразделять и по их функциям, так как каждый из них может действовать, как правило, на несколько разных тканей, а конечный физиологический эффект на ту или иную ткань обычно зависит от ее функционального состояния и предварительного действия других специфических регуляторов, может изменяться в процессе онтогенеза и т. д. Весьма условны даже наименования некоторых гормонов. Соматостатин, о котором говорилось выше, получил свое название благодаря тому, что в гипофизе подавляет секрецию соматотропного гормона (гормона роста). Однако в желудке соматостатин препятствует секреции гастрина и соляной кислоты, а в поджелудочной железе — глюкагона и инсулина. Гормон роста, в свою очередь, не влияет непосредственно на рост костей и мышечной ткани. Действуя на печень, он стимулирует образование в ней соматомединов, белковых гормонов, регулирующих рост. Помимо печени гормон роста влияет на лимфоциты, поджелудочную и щитовидную железы, надпочечники и жировые клетки, причем действие гормона на эти ткани, по-видимому, ограничено изменением углеводного и липидного обмена и не затрагивает процессов роста.

В этой книге проведена классификация гормонов и нейромедиаторов по механизмам их действия. Как и все другие, эта классификация нуждается в специальных оговорках и, без сомнения, имеет свои недостатки, однако она облегчает решение основной задачи курса — рассмотреть молекулярные механизмы нейрогуморальной регуляции.

Влияние гормонов и нейромедиаторов на клетку осуществляется обычно по одному из трех путей: а) изменение компартментализации веществ в клетке; б) изменение функциональной активности белков путем их химической модификации; в) влияние на экспрессию генома. Это так называемые первичные эффекты гормонов и нейромедиаторов, которые в конечном итоге приводят к изменению метаболизма или функциональной активности клеток. Весьма часто первичные эффекты реализуются в физиологический ответ тканей через более «древние» механизмы изменения связывания субстратов и регуляторов с ферментом, изменения свойств или количества активных и регуляторных центров на белке. Основные проблемы молекулярной эндокринологии

гии, как мы видим, тесно переплетены с проблемами биохимии, молекулярной биологии и энзимологии.

Задачей молекулярной эндокринологии является анализ основных закономерностей регуляции в биологических системах, характеристика взаимосвязи и соподчиненности разных регуляторных механизмов. Рассматривая эти вопросы, мы неоднократно будем убеждаться в том, что любой регуляторный сигнал испытывает прямое или опосредованное влияние других регуляторов. Он может быть усилен, ослаблен или даже изменен по знаку с помощью других регуляторных процессов, при этом, как правило, соблюдается строгая «субординация»: эволюционно новые, «высокопоставленные» регуляторные механизмы могут «разрешать» или «запрещать» проявление «менее совершенной» регуляции.

Решающее значение для возникновения молекулярной эндокринологии имело выяснение механизмов индукции и репрессии синтеза белка, роли циклических нуклеотидов, способов функционирования ионных «каналов» и «насосов». Важную роль сыграло также появление методов изучения взаимодействия лигандов с рецептором, выделение некоторых рецепторов в виде индивидуальных белков. Выяснение роли и структуры гормонов гипоталамуса и гипофиза, открытие многочисленных пептидов мозга, обнаружение новых рецепторов, через которые осуществляется действие на организм не только гормонов, но и некоторых лекарственных препаратов и наркотиков, привело к необходимости интегрировать эти знания, объединить усилия ученых разных специальностей, привлечь методы смежных наук. Появилась также реальная возможность перейти от оценки физиологических эффектов к выяснению первичных процессов, молекулярных механизмов действия гормонов и нейромедиаторов.

ГЛАВА I

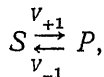
ОСНОВНЫЕ РЕГУЛЯТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КЛЕТКИ

Согласованное протекание всех химических и физических процессов в клетке — одно из основных (не менее важных, чем способность к самовоспроизведению) условий существования живого. В процессе эволюции происходил отбор и закрепление тех регуляторных механизмов, которые наиболее эффективно обеспечивали согласованность физико-химических процессов в биологических системах. На многих примерах можно проиллюстрировать то положение, что создание природой новых, более совершенных форм не приводит к немедленной элиминации менее совершенных. Среди регуляторных механизмов мы найдем и сравнительно простые, и крайне сложные, эволюционно более поздние высокоэффективные способы воздействия на активность клеток, органов и тканей. Начнем рассмотрение процессов регуляции с менее сложных механизмов.

1.1.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕТАБОЛИТОВ И КОФАКТОРОВ С ФЕРМЕНТАМИ

Активность любого фермента зависит прежде всего от концентрации субстрата S и продукта реакции P . Если фермент E катализирует реакцию



то по мере расходования субстрата образование продукта должно замедляться. Это будет происходить не только из-за снижения концентрации S , но и вследствие накопления P , препятствующего связыванию S с активным центром. Если реакция обратима, то влияние P проявится в еще большей степени, так как по мере убыли S и накопления P ускоряется реакция превращения P в S . При определенных концентрациях S и P ус-

становится равенство между скоростями образования P из S и S из P ($V_{+1} = V_{-1}$). Константа равновесия обратимой реакции (K_{eq}) описывается уравнением Холдейна

$$K_{eq} = \frac{V_{+1} \cdot K_{MP}}{V_{-1} \cdot K_{MS}},$$

где K_{MP} и K_{MS} обозначают константу Михаэлиса соответственно для P и S .

Механизмы протекания прямой и обратной реакции одинаковы (чего нельзя сказать о механизмах катаболизма и анаболизма, катализируемых разными ферментами). Катализатор в равной степени ускоряет протекание как прямой, так и обратной реакции. Собственно, роль фермента в обратимой реакции сводится лишь к ускорению достижения равновесия. Изменение концентрации или каталитической активности фермента не приведет к изменению соотношения между концентрациями S и P , если эти вещества способны превращаться друг в друга. По-видимому, именно по этой причине ферменты, катализирующие обратимые реакции, редко испытывают воздействия специфических регуляторов. В биологических системах регуляции подвергаются главным образом те ферменты, которые катализируют необратимые реакции.

Наряду с субстратами и продуктами к числу регуляторов ферментов можно отнести коферменты и кофакторы. В ряде случаев они являются участниками каталитического акта, в других случаях выступают в качестве эффекторов. Поскольку кофакторы и коферменты не обладают высокой специфичностью в отношении ферментов, изменение их концентрации в биологической системе может привести к изменению активности не одного фермента, а целой группы (например, НАД⁺ может регулировать активность нескольких десятков ферментов, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях).

При рассмотрении способа регуляции кофакторами и коферментами мы сталкиваемся еще с двумя интересными явлениями: эти регуляторы могут присоединяться к участкам белка, удаленным от каталитического центра, кроме того, некоторые из коферментов могут связываться с белком ковалентно (например, биотин, рибофлавин, углеводы, нуклеотиды, липиды).

Это более совершенные механизмы, чем регуляция фермента на уровне активного центра. Они отражают появление в эволюции фермента специального регуляторного участка и механизма химической модификации белка как способа изменения его каталитической активности.

Регуляторы, которые связываются с активным центром фермента, действуют по механизму конкурентного

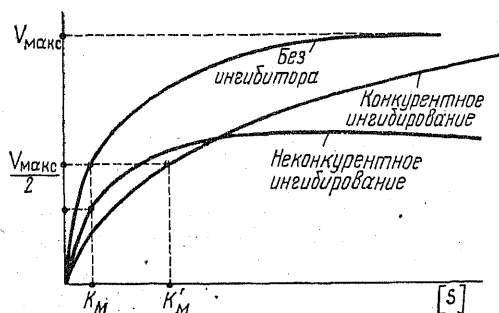


Рис. 1. Зависимость активности фермента от концентрации субстрата: $V_{\text{макс}}$ — максимальная скорость реакции; K_M и K'_M — константа Михаэлиса без ингибитора и в присутствии ингибитора, соответственно

ингибирования (рис. 1). Подавление активности фермента конкурентным ингибитором приводит к постепенному возрастанию концентрации субстрата в клетке, в результате чего будет наблюдаться постепенное вытеснение ингибитора и активность фермента начнет возвращаться к исходному уровню. Конкурентное ингибирование фермента может быть эффективным только в том случае, если концентрация субстрата в клетке сравнима с константой Михаэлиса фермента для этого субстрата. Если же фермент функционирует в условиях насыщения субстратом, конкурентные ингибиторы оказываются малоэффективными.

Между субстратом и активным центром фермента существует комплементарность. Продукт реакции и отдаленные метаболиты имеют, как правило, меньшее сродство к активному центру, чем субстрат, поэтому для проявления их действия необходимо либо значительно снизить концентрацию субстрата, либо значительно повысить концентрацию данного метаболита.

Повышение концентрации субстрата не всегда приводит к росту ферментативной активности, а продукт реакции не всегда ингибирует фермент. Так, например,

фосфофруктокиназа может тормозиться субстратами (АТФ и фруктозо-6-фосфатом) и активироваться продуктами (АДФ и фруктозо-1,6-дифосфатом). Субстратное ингибирование испытывают также ацетилхолинстераза, некоторые АТФазы. В том случае, когда ингибирование высокими концентрациями субстрата осуществляется через активный центр, этот процесс объясняют одновременным связыванием (по разным группам) двух одинаковых молекул субстрата в одном и том же активном центре. Однако ингибирование субстратом может происходить и путем его связывания со специальным регуляторным участком, не обладающим каталитической активностью. У ферментов, которые имеют четвертичную структуру, такой эффект может развиваться вследствие кооперативного взаимодействия нескольких активных центров.

Конкурентный ингибитор может связываться только со свободным ферментом и не связывается с фермент-субстратным комплексом (рис. 2 А). При регуляции фермента по неконкурентному механизму эффектор может связываться как со свободным ферментом, так и с фермент-субстратным комплексом (рис. 2 Б). Связывание такого регулятора происходит в специальном участке, который отличается от активного центра. Этот регулятор называется аллостерическим. Неконкурентные активаторы увеличивают, а ингибиторы уменьшают каталитическую активность фермента и, как правило, не влияют на сродство фермента к субстрату. В свою очередь, и субстрат не в состоянии усилить или ослабить величину данного регуляторного влияния. При регуляции, получившей название «бесконкурентная», эффектор может связываться только с фермент-субстратным комплексом, что приводит к изменению скорости катализа и K_m для субстрата (рис. 2 В).

Многие белки существуют в виде комплекса, состоящего из двух, четырех и более идентичных или близких по структуре белковых цепей. Образование олигомерного комплекса приводит к существенным изменениям свойств этих белков. Проиллюстрировать это удобно на примере гемоглобина (тетрамера) и миоглобина (мономера), двух гемсодержащих белков, рецептирующих кислород. Эти два близких по структуре белка возникли из одного предшественника (глобина) в результате дупликации гена. Гемоглобин участвует в

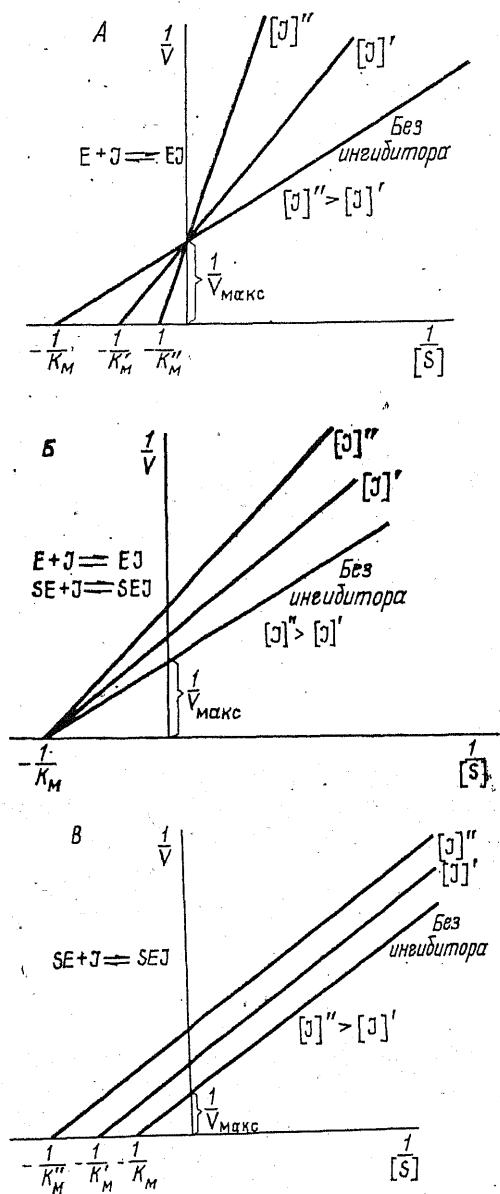
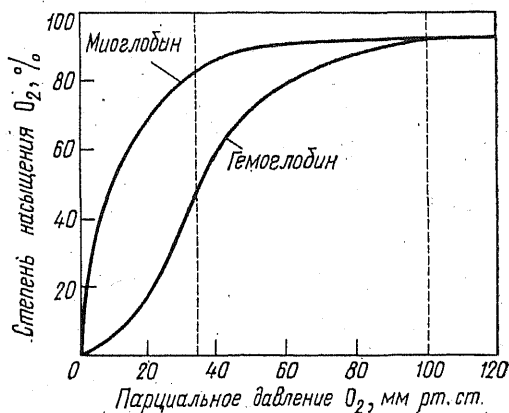


Рис. 2. Зависимость активности фермента от концентрации субстрата, выраженная в двойных обратных величинах (координаты Лайнуивера — Бэрка): А — конкурентное; Б — неконкурентное; В — бесконкурентное ингибирование

переносе кислорода от легких к периферическим тканям, а миоглобин, локализованный в клетках разных органов и тканей, накапливает кислород в клетках. Зависимость связывания кислорода от его парциального давления показана на рис. 3. В капиллярах легких давление кислорода составляет около 100 мм рт. ст. При этом гемоглобин может полностью на-

Рис. 3. Степень насыщения кислородом миоглобина и гемоглобина при разных значениях парциального давления кислорода. Пунктирными линиями обозначено парциальное давление кислорода в периферических тканях и в легких (соответственно 35 и 100 мм рт. ст.)



сыщаться кислородом, т. е. переходить в состояние HbO_2 . В периферических клетках организма, к которым гемоглобин поступает с током крови, идет постоянное потребление кислорода на окислительные процессы, поэтому давление O_2 в них снижено до 35 мм рт. ст. При таком давлении гемоглобин теряет способность связывать O_2 . Кислород отщепляется от гемоглобина и переходит на миоглобин, поскольку этот мономерный белок имеет такую кинетику связывания O_2 , которая обеспечивает его насыщение кислородом при низких давлениях O_2 (см. рис. 3). Структура гема у обоих белков одинакова, и связывание гема с белками также одинаково. Разная кинетика связывания кислорода, которая обеспечивает согласованную работу двух белков, объясняется наличием четвертичной структуры у гемоглобина и отсутствием таковой у миоглобина.

Связывание кислорода с мономерным белком миоглобином подчиняется михаэлисовской кинетике (гиперболическая зависимость), а образование HbO_2 происходит по S-образной зависимости (см. рис. 3), по-

сколькx появление четвертичной структуры $\alpha_2\beta_2$ привело к резкому изменению кислородсвязывающих участков в каждой из глобул. В этой структуре связывание кислорода с определенной субъединицей зависит от того, в какой форме (Hb или HbO₂) находится другая субъединица. Присоединение кислорода к первым двум субъединицам приводит к значительному (в 500 раз) увеличению сродства к кислороду двух других субъединиц. Такое кооперативное взаимодействие характерно для многих белков (прежде всего ферментов), обладающих четвертичной структурой. Математически оно описывается уравнением Хилла

$$y = \frac{k \cdot x^n}{1 + k \cdot x^n},$$

где y — концентрация HbO₂, x — парциальное давление кислорода, n — число молекул кислорода, связывающихся с молекулой гемоглобина, k — константа сродства кислорода к гемоглобину. В том случае, когда $n=1$, уравнение Хилла превратится в уравнение Михаэлиса—Ментен и будет описывать гиперболическую зависимость связывания кислорода с миоглобином.

Появление четвертичной структуры у белков привело к появлению кооперативности, что резко изменило их регуляторные свойства. Для того чтобы активность фермента, подчиняющегося кинетике Михаэлиса—Ментен, возросла с 10 до 90% от максимальной, необходимо концентрацию субстрата повысить в несколько десятков раз. В биологических системах такие колебания в концентрациях метаболитов наблюдаются крайне редко. Фермент, обладающий кооперативными свойствами, может изменить свою активность с 10 до 90% от максимальной при увеличении концентрации субстрата всего в 4 раза. Таким образом, кооперативность связывания обеспечивает значительные изменения активности фермента в ответ на малые колебания концентрации субстратов, продуктов или эффекторов.

Следует отметить, что наличие кооперативности не обязательно свидетельствует о взаимодействии нескольких центров связывания. При определенных условиях (например, когда реакция завершается медленным переходом фермента в неактивную форму) мономерный фермент с единственным центром связывания может обладать «кооперативной» кинетикой катализа. В прин-

ципе, кооперативность заложена в природе любого белка. Процессы денатурации белка (под действием рН, температуры или мочевины) происходят по S-образной кривой, так как слабые воздействия не вызывают заметных изменений его вторичной или третичной структуры, но «расшатывают» ее. Разрыв первых связей наиболее труден, а затем наблюдается одновременный разрыв многих связей и переход белка в другое конформационное состояние. Узость перехода объясняется высокой энергией активации процесса денатурации (~ 100 ккал/моль).

Аллостерическая регуляция свойственна многим ферментам. Согласно теории Моно и соавторов, давших математическое описание этих процессов, аллостерические белки состоят из двух или более протомеров (субъединиц, строго симметрично связанных между собой нековалентными связями). Протомеры могут существовать в двух дискретных состояниях *A* и *B*, между которыми наблюдается равновесие. Состояния *A* и *B* обладают разным сродством к лигандам, поэтому введение в систему определенного лиганда приведет его к связыванию с тем протомером, который находится в состоянии большего сродства к данному лиганду. Вследствие связывания лиганда равновесие между состояниями *A* и *B* будет сдвигаться, что и явится источником кооперативного перехода к системе (рис. 4). Если состояния *A* и *B* различаются по сродству к субстрату или по скорости катализа, то сдвиг равновесия, происходящий под действием лиганда, приведет либо к ускорению, либо к замедлению каталитического процесса.

По мнению Кошланда, состояния *A* и *B* не предусматривают, а индуцируются под действием связавшегося лиганда. Кроме того, переход состояния *A* в состояние *B* и обратно представляет собой последовательный процесс, т. е. идет через ряд переходных состояний.

Итак, аллостерическая регуляция обеспечивает быстрое «включение» и «выключение» фермента в ответ на малые изменения концентрации регулятора. Аллостерическим ферментам свойственна сигмоидальная зависимость от концентрации субстрата. В присутствии эффекторов сигмоидальность сохраняется, однако активаторы (положительные эффекторы) делают подъем кривой более крутым, а ингибиторы (отрицательные эффекторы) — более пологим (рис. 5). Факторы, на-

рушающие четвертичную структуру белков (высокая температура, ионная сила, ионы водорода и тяжелых металлов), могут вызывать «десенсбилизацию» фермента, т. е. потерю чувствительности к аллостерической

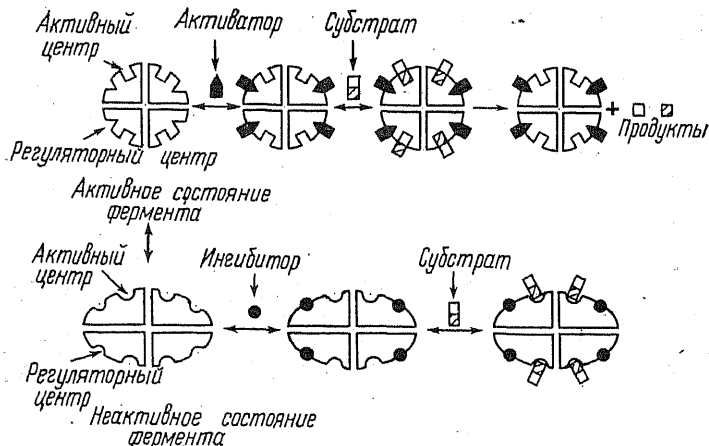


Рис. 4. Два состояния аллостерического фермента (активное и неактивное), между которыми существует равновесие

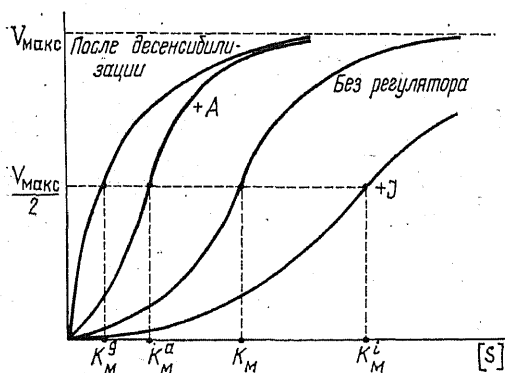


Рис. 5. Зависимость активности аллостерического фермента от концентрации субстрата в отсутствие эффекторов, в присутствии активатора (А), ингибитора (I) и после десенсбилизации (объяснения см. в тексте)

регуляции. В этих случаях исчезают кооперативные свойства, и зависимость активности от концентрации субстрата (или эффектора) начинает подчиняться кинетике Михаэлиса (см. рис. 5).

На примере многих ферментов С. Е. Севериным и сотрудниками показано, что объединение субъединиц в

олигомерный комплекс не дает ощутимого выигрыша в каталитической активности, но значительно усиливает чувствительность фермента к регуляторам. При этом в ряде случаев существует равновесие между моно-, ди-, тетрамерной и более сложными формами фермента. Концентрация субстрата и кофермента, изменение температуры и pH среды могут влиять на это равновесие и тем самым изменять кинетические и регуляторные свойства фермента (рис. 6).

Структуру гемоглобина кодируют два гена, расположенных в разных хромосомах: ген α -цепи и ген β -цепи.

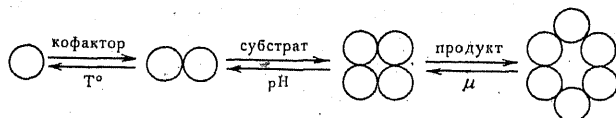


Рис. 6. Возможное влияние на структуру олигомерного фермента кофакторов, субстратов, продуктов, температуры, значения pH и ионной силы раствора

Синтез обеих белковых цепей происходит, по-видимому, с одинаковой скоростью, в результате чего они образуются в одинаковых количествах и формируют структуру $\alpha_2\beta_2$. Четвертичная структура фермента также может быть сформирована из нескольких разных субъединиц, причем соотношение этих субъединиц может быть разным.

Изменение соотношения субъединиц в олигомерном комплексе — весьма распространенный механизм создания разных изоформ одного и того же белкового катализатора. Изоферменты — это генетически детерминированные разные формы одного и того же фермента, которые могут иметь разные кинетические константы и регуляторные свойства. Они, как правило, локализованы в разных участках клетки или в разных тканях.

Если тетрамер состоит из двух различающихся субъединиц A и B , то их можно представить в пяти разных сочетаниях: A_4 , A_3B , A_2B_2 , AB_3 , B_4 . Такой механизм образования изоформ впервые был доказан Маркертом для лактатдегидрогеназы, а в настоящее время обнаружен у целого ряда ферментов. Существование в клетке тех или иных изоформ определяется скоростями транскрипции и трансляции разных субъединиц, а также их устойчивостью к внутриклеточным протеазам. Об-

разование тетрамера определенной структуры полностью подчинено вероятностному фактору, т. е. зависит от соотношения концентрации двух субъединиц (*A* и *B*) в данной клетке. Появление ферментов, обладающих олигомерной структурой, значительно расширило, как мы видим, возможности их регуляции. Еще более совершенным и с каталитической и с регуляторной точки зрения является объединение разных ферментов, участвующих в реакции одной цепи метаболизма, в общий сложный олигомерный комплекс. Такие комплексы могут состоять из десятка ферментов, каждый из которых обладает четвертичной структурой. Продукт реакции, образующийся под действием первого фермента, ковалентно соединяется с белком или кофактором и в таком состоянии подвергается дальнейшим изменениям под действием других ферментов, входящих в этот комплекс. В качестве полиферментного образования в лаборатории Линнена выделена синтетаза жирных кислот, а в лабораториях Рида и С. Е. Северина — пируватдегидрогеназный комплекс. Их молекулярный вес составляет несколько миллионов, а размеры частиц — 20—30 нм. Если вызвать диссоциацию такого рода комплексов, а затем выделить отдельные ферменты, каталитическая активность становится меньшей, а ряд регуляторных свойств исчезает.

Аллостерическая регуляция может осуществляться двумя путями — взаимодействием эффектора с каталитическими субъединицами и взаимодействием эффектора со специальной регуляторной субъединицей, не обладающей ферментативной активностью, но связанной (или связывающейся после присоединения эффектора) с каталитической субъединицей. Примером такого типа регуляции может служить аспартаткарбамоилтрансфераза. Этот фермент состоит из трех регуляторных субъединиц и двух каталитических. Он участвует в первой реакции синтеза пиримидиновых нуклеотидов, который завершается, в частности, образованием ЦТФ. При увеличении концентрации ЦТФ этот нуклеотид начинает связываться с регуляторными субъединицами и подавляет активность каталитических субъединиц фермента, тем самым замедляя синтез пиримидиновых нуклеотидов. АТФ (конечный продукт синтеза пуриновых нуклеотидов) оказывает на аспартаткарбамоилтрансферазу активирующее влияние. В этом случае мы наблюда-

даем направленность двух разных регуляторных влияний на один и тот же фермент: ингибирование конечным продуктом данного метаболического пути и активация конечным продуктом метаболического пути, протекающего параллельно. Такая регуляция представляется вполне логичной, так как защищает клетку от переизбытка одного из нуклеотидов и обеспечивает параллельное накопление пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, в равной степени нужных для синтеза нуклеиновых кислот.

Скорость метаболических процессов, происходящих в клетке, зависит от концентрации веществ, потребляющихся и накапливающихся в данной цепи реакций, а также от концентрации веществ, участвующих в других метаболических процессах. Общие принципы такой регуляции можно проиллюстрировать на примере расщепления гликогена. Потенциальная активность ферментов такова, что весь гликоген в мышцах может быть превращен в молочную кислоту за 20 с, а в CO_2 и H_2O — за 3—4 мин. Мы знаем, что в клетке это никогда не происходит: даже при тяжелых мышечных нагрузках гликоген может служить источником энергии в течение нескольких часов.

В цепи последовательных реакций, сопровождающихся расщеплением гликогена, образуется 3- и 6-углеродные продукты реакции, а также АТФ и НАДН. Эти соединения могут регулировать не только собственный синтез и распад, но и другие метаболические пути, связанные, например, с синтезом или распадом липидов и нуклеиновых кислот. Как правило, АТФ и НАДН активируют процессы анаболизма, связанные с потреблением энергии, а АДФ, АМФ и НАД^+ — катаболические реакции, приводящие к образованию энергии. В свою очередь, ряд метаболических путей контролирует скорость протекания гликогенолиза. Так, например, жирные кислоты, связываясь с фосфофруктокиназой, могут значительно подавлять процессы утилизации гликогена.

Основная функция гликогенолиза и цикла Кребса состоит в производстве АТФ из АДФ и НАДН из НАД^+ . Адениловые и никотинамидные нуклеотиды — мощные регуляторы этих процессов, причем АДФ, АМФ и НАД^+ их ускоряют, а АТФ и НАДН — ингибируют (рис. 7). В большинстве случаев нуклеотиды по хими-

ческому строению значительно отличаются от субстратов и продуктов реакций, которые они регулируют, поэтому такая регуляция является аллостерической и осуществляется через специальные регуляторные центры на ферментах.

При внимательном рассмотрении регуляторных пу-

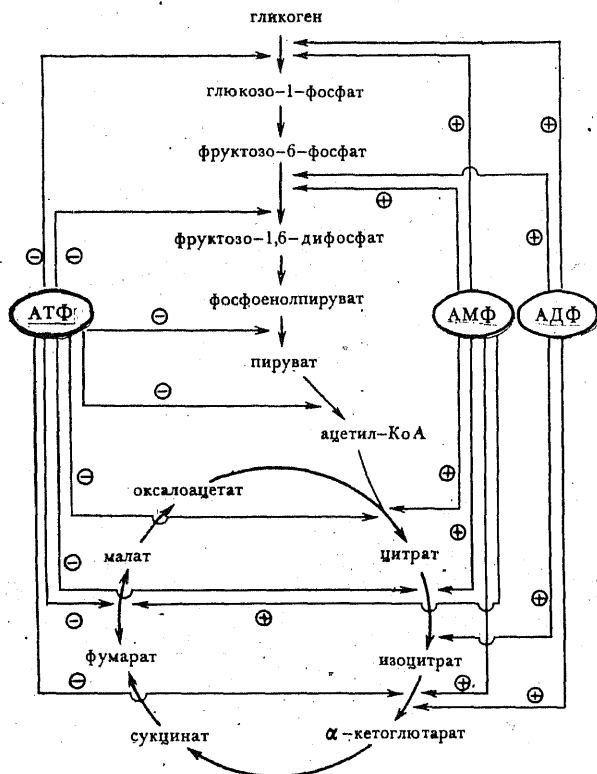


Рис. 7. Активирующее влияние АДФ и АМФ, а также ингибирующее влияние АТФ на ферменты гликогенолиза и цикла Кребса

тей, контролирующих биохимические циклы, обращает на себя внимание также то, что отнюдь не все ферменты цикла регулируются. Регуляция в основном направлена на необратимые реакции, однако важность разных необратимых реакций в одном и том же биохимическом

цикле может быть различна. Последовательная цепь реакций не будет протекать, пока не начнет функционировать фермент, стоящий в начале цепи. Затем превращения будут протекать со скоростью, которая определяется активностью самого «медленного» фермента в цепи реакций.

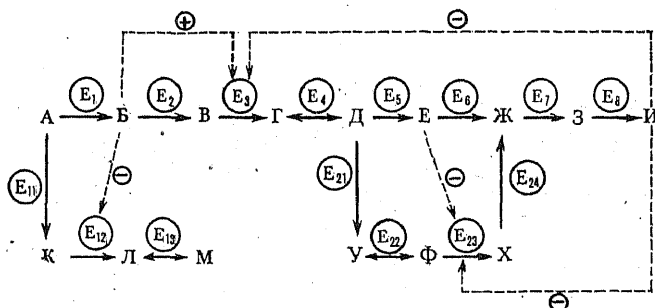


Рис. 8. Схематическое изображение регуляции биохимического процесса метаболитами: сплошными линиями показаны пути превращения вещества А в И или М; пунктирными линиями показаны регуляторные влияния метаболитов; знаки плюс или минус означают соответственно активирующее и ингибирующее влияние; E_1 — E_{24} — ферменты, катализирующие данный метаболический процесс

Ферменты, запускающие метаболический путь, а также ферменты, лимитирующие скорость его протекания, принято называть ключевыми. Основные регуляторные пути сходятся именно на ключевых ферментах. Так, например, активность фосфорилазы, запускающей гликогенолиз, и фосфофруктокиназы, лимитирующей скорость его протекания, регулируется нервной и эндокринной системами (с помощью специальных полиферментных ансамблей), а также многими внутриклеточными метаболитами (у фосфофруктокиназы обнаружено более десяти регуляторных участков для внутриклеточных эффекторов самой разной природы — АТФ, АМФ и Φ_n , цитрата, жирных кислот, аммония и др.). В цепи реакций, изображенной на рис. 8, фермент E_3 является ключевым метаболического пути $A \rightarrow И$, фермент E_{12} — ключевым ферментом пути $A \rightarrow М$, а фермент E_{23} — ключевым ферментом шунта, позволяющего получить вещество И в обход ферментов E_5 и E_6 . Очевидно, что регуляторные влияния, указанные пунктир-

ными линиями, будут определять, с какой скоростью и как будет осуществляться превращение вещества A : в направлении $A \rightarrow M$ или $A \rightarrow I$, а в последнем случае — по пути образования промежуточного вещества E или же веществ U , Φ и X . В. П. Скулачев определил регуляцию как направление превращения вещества по определенному пути с определенной скоростью.

Как правило, вещества, стоящие в начале цепи реакций, оказывают на ключевые ферменты активирующее влияние (эффект B на E_3). Такую регуляцию называют форактивацией. Примером ее может служить активирующее влияние фруктозо-1,6-дифосфата на фосфоенолпируваткиназу. Вещества, стоящие в конце цепи реакций, часто оказывают ингибирующее влияние на ключевые ферменты (эффекты I на E_3 и E_{23}). Эту регуляцию называют ретроингибированием, или торможением по принципу отрицательной обратной связи. В качестве примера приведем ингибирующее действие фосфоенолпирувата и цитрата на фосфофруктокиназу. Гораздо реже встречаются случаи, когда фермент ингибируется далеким предшественником субстрата или активируется веществом, образующимся из продукта. Столь необычная регуляция свойственна ферментам, стоящим на перекресте метаболических путей.

Следует отметить, что регуляторные влияния, изменяя соотношение скоростей реакций, могут последовательно переключать скоростьлимитирующие стадии в химической цепи. При этом будет уменьшаться роль одних регуляторов и возрастать роль других. Так, например, в определенных условиях (низкая концентрация цитрата и АТФ, но высокая концентрация АМФ) активность фосфофруктокиназы может значительно повыситься, и тогда скорость гликолиза начнет определяться активностью ферментов, превращающих трикарбоновые фрагменты сахаров. Поэтому и регуляция этих ферментов приобретает большую значимость. Кроме этого, при низкой активности фосфофруктокиназы через образование пирувата в цикл Кребса могут включаться аминокислоты, глицерин и другие метаболиты. Повышение активности фосфофруктокиназы отсечет пути окисления данных веществ, так как повысит концентрацию пирувата, образующегося из сахаров. Таким образом, регуляторное воздействие, направленное на определенный метаболический цикл, опосредованно мо-

жет изменять активность других циклов, а следовательно, и функциональную значимость других регуляторов, контролирующих эти циклы.

1.2.

ИЗМЕНЕНИЕ КОМПАРТМЕНТАЛИЗАЦИИ ВЕЩЕСТВ

Цитоплазму живой клетки пронизывает сеть мембран, которые разделяют ее на отсеки (компартменты), имеющие относительную автономию. Органеллы клетки окружены биологической мембраной. На этой мембране или внутри органеллы локализованы ферменты, работа которых (в ряде случаев при взаимодействии с нуклеиновыми кислотами, полисахаридами и другими полимерами) определяет функцию этой органеллы в клетке. Белки умеют находить «свою» мембрану или органеллу и встраиваться в нее. В случае митохондрий это может объясняться наличием ДНК и белоксинтезирующих компонентов внутри самой митохондрии. Другие органеллы получают белки из общего фонда, создаваемого рибосомами, которые локализованы на наружной стороне мембран эндоплазматического ретикулума. К сожалению, в настоящее время неизвестно, каким образом вновь синтезированный белок переносится в «свою» органеллу, чем определяется высокая специфичность связывания того или иного белка с определенной мембраной, а часто — лишь с определенным участком этой мембраны.

Биологическую мембрану можно солюбилизировать детергентами или органическими растворителями, разделить на белковую и липидную фракции, затем смешать их и после удаления солюбилизирующего агента вновь получить мембрану с практически такой же структурой, как и нативная. Опыты по самосборке свидетельствуют, что биологическая мембрана формируется не на специальной матрице, а путем создания термодинамически наиболее выгодной структуры — липидного бислоя — и встраивания гидрофобных участков белка в этот бислой. Существуют определенные отличия в липидном составе различных мембран (например, наружная цитоплазматическая мембрана клетки содержит в несколько раз больше холестерина, чем внутренние мембраны), однако специфичность связывания мем-

бренных белков с липидами недостаточно выражена, поэтому только различиями в липидном составе нельзя объяснить специфическое связывание белков с той, а не с другой мембраной. Возможно, существуют специальные механизмы переноса белков и других веществ внутри клетки. В нервных волокнах этот перенос осуществляют, по-видимому, микротрубочки (рис. 9) и микро-

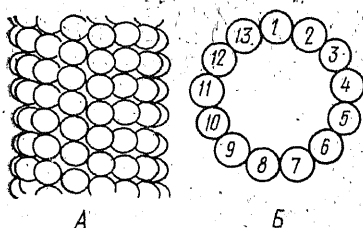


Рис. 9. Схематическое изображение структуры микротрубочки: А — вид сбоку; Б — вид сверху

филаменты — полимерные белковые образования, в значительной степени определяющие также морфологию клетки и подвижность внутриклеточных структур.

Микротрубочки — это длинные цилиндрические образования (диаметром 20—30 нм), стенки которых построены из глобулярного белка — тубулина (димер, состоящий из двух субъединиц — α и β , которые имеют

практически одинаковый молекулярный вес — 55 000). Тубулин способен к самосборке — в присутствии ГТФ происходит присоединение друг к другу молекул тубулина, в результате чего образуется спираль, один виток которой состоит из 13 молекул тубулина. Полимеризация тубулина сопровождается гидролизом ГТФ до ГДФ и P_i . Витки спирали плотно примыкают друг к другу и тем самым образуют полый цилиндр — микротрубочку. Тубулин и минорные белки, входящие в состав микротрубочки, могут фосфорилироваться цАМФ-зависимыми протеинкиназами (см. раздел 4.2.3). Они могут связывать также ионы Ca^{2+} . Фосфорилирование влияет на скорость полимеризации микротрубочек, а Ca^{2+} вызывает их деполимеризацию. Таким образом, гормоны и нейромедиаторы, влияющие на синтез цАМФ (см. раздел 1.3) или на проницаемость мембран для Ca^{2+} (см. ниже), будут изменять состояние микротрубочек, что, в свою очередь, приведет к изменению латерального движения белков в мембране, вязкости мембраны, переноса веществ от ядра к периферии клетки, подвижности органелл и т. д.

Микрофиламенты, которые наряду с микротрубоч-

ками формируют так называемый цитоскелет, имеют в клетке сходные функции, но состоят из актиноподобного белка. Предполагается, что процессы полимеризации — деполимеризации микрофиламентов происходят по тем же механизмам, что и $F-G$ -переход актина. Основная функция микрофиламентов состоит в поддержании структуры клетки и в клеточном движении.

Содержимое клетки постоянно движется. Цитоплазма может совершать циркуляторное вращение вокруг ядра или вакуоли, а органеллы перемещаться из одного участка клетки в другой. Изменение и перемещение органелл наиболее удобно наблюдать при митозах клеток. Эти процессы также связаны с функционированием внутриклеточных сократительных белков и тубулина, формирующего микротрубочки. Поскольку активность этих белков зависит от внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , циклических нуклеотидов и других факторов, участвующих в нейрогуморальной регуляции, устранение нервного и гуморального контроля может приводить к ускорению митозов и даже к злокачественному перерождению клеток.

На поверхности любой клетки есть органо- и тканеспецифические антигены, которые позволяют родственным клеткам «узнавать» друг друга. Процесс узнавания клеток, по-видимому, не обладает видовой специфичностью. Он зависит от Ca^{2+} и подавляется антителами на гомогенат этих клеток. Если смешать суспензии разных клеток, например почек и печени, то спустя несколько часов можно наблюдать их объединение в две разные популяции — печеночную и почечную. Установление прочного контакта между клетками, развивающимися в одном и том же направлении, играет важную роль в процессах эмбриогенеза. Существует критическая масса объединения клеток, которая обеспечивает дальнейший морфогенез ткани. Только при наличии межклеточных контактов возможна индукция эмбриональной клетки к дифференцировке (например, под действием фактора роста нерва).

Многие клетки животных обладают хемотаксисом. Так, например, лейкоциты и моноциты движутся в направлении бактерий, попавших в кровь. Хемотаксис особо важен в период эмбриогенеза и при регенерации ткани. Предполагается, что прорастание аксона к определенной клетке также осуществляется благодаря хемо-

таксису. В качестве агентов, вызывающих подобный тип хемотаксиса, выступают гормоноподобные вещества, секретируемые клетками.

Многие клетки с наружной стороны покрыты аморфным материалом, в 5—10 раз превышающим толщину плазматической мембраны. Эта «шуба», укрепляющая стенки клетки и связывающая их между собой, состоит из гиалуроновой кислоты, мукополисахаридов и коллагеновых волокон. Она не влияет на диффузию ионов и малых молекул, но замедляет движение белков и других макромолекул.

В костной и хрящевой ткани клетки скреплены твердым межклеточным веществом. В других тканях столь прочные связи существуют только между малыми участками мембран соседних клеток. Известны два типа таких контактов: десмосомы и терминальные перемычки. Десмосомы представляют собой круглые или овальные структуры, расположенные на наружной поверхности двух соседних клеток, которые, подобно заклепкам, соединяют эти клетки. От десмосомы в цитоплазму обеих клеток тянутся фибриллы. В отличие от десмосом терминальные перемычки не дискретные, а непрерывные образования, опоясывающие всю клетку и тем самым связывающие все соседние клетки в единый пласт. Поскольку эта перемычка не пропускает больших молекул, она существенно ограничивает диффузию веществ через клеточный пласт.

Известно, что мозг защищен гемато-энцефалическим барьером от многих соединений, циркулирующих в крови. Этот барьер образован плотно смыкающимися друг с другом терминальными перемычками, опоясывающими клетки эндотелия кровеносных сосудов мозга. Между просветом сосудов мозга и нервными клетками построена сплошная стенка из этих перемычек. Химический состав ее таков, что она выполняет роль сита: пропускает в мозг низкомолекулярные вещества и не пропускает полипептиды и белки.

Нервная ткань необычайно богата рецепторами для биологически активных веществ. Нанесение многих белковых гормонов на «открытый» мозг вызывает разнообразные физиологические эффекты, по-видимому, имитирующие действие других регуляторов. В естественных условиях многие из этих эффектов не проявляются, так как молекулы белковых гормонов, циркулирующих в

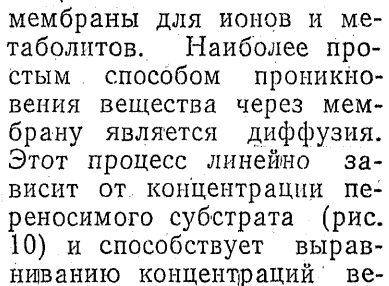
крови, не проникают через гемато-энцефалический барьер. Этот барьер не пропускает к мозгу и ряд низкомолекулярных веществ, например катехоламины. На примере гемато-энцефалического барьера мы можем видеть, что разделение веществ, их компартментализация, происходит не только в клетке, но и в жидкости, которой является кровь.

Мембрана не только отделяет цитоплазму от внеклеточной среды, не только разделяет клетку на отсеки и тем самым обеспечивает относительную автономию протекания химических процессов в органеллах, но и служит каналом связи между разными отделами клетки. Градиенты концентраций ионов создают на мембране электрохимический потенциал, который чутко реагирует как на биологически активные вещества, так и на всевозможные изменения во внеклеточной и внутриклеточной среде (температура, рН и т. п.).

Большинство ферментов клетки функционирует, по-видимому, на мембранах. Применяя растворы низкой ионной силы и нейтрального значения рН, можно выделить плазматические мембраны, которые обладают активностями ферментов гликолиза, т. е. типичных «растворимых» ферментов. Оказывается, что, связываясь с мембраной, эти ферменты приобретают иные кинетические константы и дополнительные регуляторные свойства. Для многих ферментов доказано, что они располагаются в мембране в строгом порядке, соответствующем последовательности протекания метаболического цикла.

В последние годы становится все более популярной гипотеза Робертсона о существовании непрерывной динамичной связи между всеми мембранами клетки. Высказываются также предположения о возможности реализации регуляторных сигналов путем индуцирования так называемых генерализованных, т. е. всеобщих, конформационных изменений в мембранах клетки, что может привести к изменению компартментализации, каталитической активности ферментов и процессов синтеза белка. В ряде тканей показано, что существует тесный контакт хроматина с ядерной мембраной. В то же время, наружная ядерная мембрана может непрерывно переходить в эндоплазматический ретикулум, с которым связана большая часть рибосом, а возможно, и в цитоплазматическую мембрану. По мнению Жакоба,

Действие многих нейромедиаторов и гормонов направлено на изменение проницаемости биологической мембраны для ионов и метаболитов. Наиболее про-



щества по обе стороны мембраны. Путем диффузии через мембрану проникают вода, многие лекарственные препараты, в том числе такие антибиотики, как

такие антибиотики, как пенициллины и др. Однако молекулы не диффундируют в направлении высокого градиента концентрации этих веществ можно избрана активных веществ, например нистатин. Эти полиеновые антибиотики взаимодействуют со стеролами мембраны (эр-



гостерином и холестеринном) и тем самым вызывают образование пор, наполненных водой. Поры непрерывно образуются и исчезают. По ним могут диффундировать такие гидрофильные соединения, как глицерин, сахара, некоторые аминокислоты.

В обычных условиях перенос этих веществ (и многих других метаболитов) осуществляется путем опосредованного транспорта. Поскольку в таком транспорте участвует специфический переносчик, количество которого в мембране ограничено, скорость переноса растет при увеличении концентрации вещества только до определенных пределов (см. рис. 10). Существуют разные модели опосредованного транспорта. Согласно одним из них, переносчик только открывает «ворота» (рис. 11), согласно другим — транспортирует молекулу вещества через всю мембрану, согласно третьим — переносит молекулу вещества в некий участок мембраны, из которого она удаляется аналогичным переносчиком, расположенным на другой стороне мембраны. Общее положение всех этих моделей состоит в том, что место связывания вещества на переносчике недоступно одновременно этому веществу с обеих сторон мембраны.

Опосредованный транспорт может идти как по градиенту (облегченная диффузия), так и против градиента концентрации вещества. В последнем случае транспорт будет активным (рис. 12). Непременным условием является то, что одна из стадий активного транспорта энергозависима. Источником энергии транспорта против градиента концентрации может служить АТФ. У низших эукариотов, по данным И. С. Кулаева, энергию для транспорта могут поставлять высокомолекулярные полифосфаты. Перенос веществ, сопряженный с гидролизом макроэргических соединений, называют первичноактивным транспортом.

Во многих случаях для переноса веществ через мембрану используется энергия электрохимического потенциала, например протондвижущая сила, создаваемая АТФазой, которая выводит из клетки протоны. У микроорганизмов этот электрохимический потенциал «разряжается» на перенос сахаров из среды в клетку против 10000-кратного градиента концентраций. У животных активный транспорт аминокислот и моносахаридов идет за счет энергии пассивных потоков ионов Na^+ и K^+ . Этот транспорт называют вторичноактивным, так

как энергия сначала тратится на асимметричное распределение ионов Na^+ и K^+ по обе стороны мембраны, а затем уж энергия ионных градиентов используется на перенос вещества через мембрану.

У микроорганизмов транспорт одновалентных катионов вторичноактивен — он осуществляется путем обме-

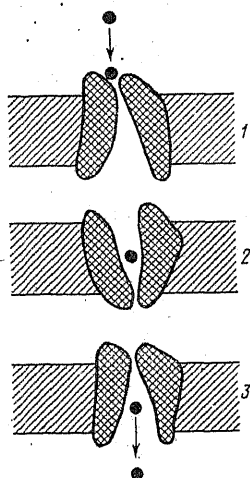
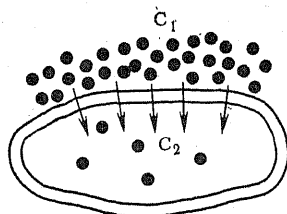
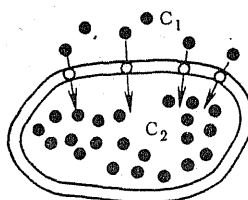


Рис. 11. Гипотетическая модель переноса вещества через биологическую мембрану: 1, 2, 3 — этапы переноса



пассивный транспорт



активный транспорт

Рис. 12. Схематическое изображение пассивного и активного транспорта вещества в клетку: C_1 — концентрация вещества вне; C_2 — внутри клетки. Верхняя часть рисунка — $C_1 > C_2$, нижняя часть — $C_2 > C_1$

на H^+/K^+ , а источником энергии служит протонная АТФаза. В клетках животных функционирует Na^+ , K^+ -АТФаза, которая транспортирует Na^+ из клетки наружу, а K^+ — снаружи внутрь клетки. Na^+ -насос является машиной, преобразующей энергию макроэргической связи АТФ в энергию ионных градиентов. Эта машина работает обратимо: при «разрядке» ионных градиентов может синтезироваться АТФ. Это означает, что активный транспорт может идти только до достижения определенного градиента (при градиенте выше этой величины начнется синтез АТФ). Таким образом, даже в

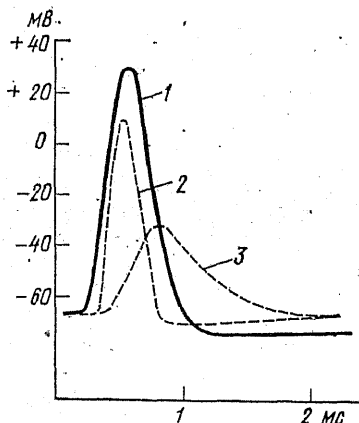
том случае, если пассивная диффузия Na^+ и K^+ не будет вносить своего вклада в установление градиента, разность концентраций ионов по обе стороны мембраны (а следовательно, и энергия, заключенная в них) может достигать только определенной (ни в коем случае не большей) величины. Транспорт других веществ также, по-видимому, может идти только против определенного градиента, не превышающего некую критическую величину.

Движение ионов через мембрану определяется тремя факторами: 1) градиентом концентраций иона по обе стороны мембраны; 2) электрическим зарядом иона; 3) разностью потенциалов по обе стороны мембраны. Внутренняя сторона плазматической мембраны заряжена отрицательно. Вне клетки концентрация Na^+ в несколько раз выше, чем внутри. При пассивной диффузии ионы Na^+ перемещаются по градиенту своей концентрации и в сторону отрицательного заряда, поэтому для Na^+ существует наибольший электрохимический градиент. При образовании потенциала действия проводимость для Na^+ возрастает в сотни раз. При этом катион движется со скоростью 10^8 c^{-1} , что лишь в 10 раз медленнее, чем его движение в межклеточной среде. Расчеты показывают, что при участии в этом процессе белкового переносчика скорость переноса была бы на несколько порядков меньше, поэтому предполагается, что в мембране функционирует специальный « Na^+ -канал», который может «открываться» или «закрываться».

Потенциал действия состоит по крайней мере из двух процессов: деполяризующего входа Na^+ и реполяризующего выхода K^+ . Выход K^+ из клетки также происходит по градиенту его концентраций, однако отрицательный заряд на внутренней стороне мембраны препятствует этому выходу. 10—20-кратное повышение проводимости для K^+ во второй фазе потенциала действия (после входа в клетку Na^+) — процесс с отрицательной обратной связью, который сам себя останавливает. Амплитуда потенциала действия — 70—100 мВ, длительность — несколько миллисекунд (рис. 13).

Движущей силой для возникновения и распространения по мембране потенциала действия являются градиенты концентраций Na^+ и K^+ . В то же время на многих тканях показано, что в этих процессах обяза-

тельно должны участвовать ионы Ca^{2+} . При возбуждении клетки входу Na^+ предшествует вход Ca^{2+} . Вклад этого движения ионов в амплитуду потенциала действия незначителен, однако при полном удалении Ca^{2+} из внеклеточной среды возбуждающий потенциал не может возникнуть. Можно полностью удалить из клетки и наружной среды Na^+ и K^+ и после этого получить потенциал действия за счет движения Ca^{2+} . Эта пере-



зарядка мембраны будет развиваться в 1000 раз медленнее (несколько секунд или минут), а форма потенциала действия будет искаженной.

Некоторые нейромедиаторы (например, ацетилхо-

Рис. 13. Амплитуда и продолжительность потенциала действия (линия 1), вызванного изменением проводимости мембраны для ионов Na^+ (линия 2) и K^+ (линия 3)

лин и норадреналин) путем взаимодействия со своими рецепторами могут открывать «каналы» пассивного транспорта Na^+ и Ca^{2+} . Опосредованно это может влиять и на перенос метаболитов, сопряженный с пассивным входом Na^+ в клетку. Существует, однако, ряд специфических регуляторов (инсулин, соматомедины), которые воздействуют, по-видимому, непосредственно на переносчики метаболитов в мембране (см. раздел 4.1).

Транспорт катионов приводит также к пассивному (в качестве противоиона) проникновению через мембрану хлорида, бромиды и йодида. Транспорт сульфата и фосфата требует метаболической энергии и осуществляется специальными связывающими белками.

Перенос воды через мембрану пропорционален разности гидростатического и осмотического давления по разные стороны мембраны. Любые регуляторы, изменяющие концентрацию веществ в клетке, будут влиять и на диффузию воды, которая направлена в сторону выравнивания осмотического давления.

Считается, что большие полимерные молекулы белков не проникают через биологические мембраны. Однако многие ткани обладают эндокринной (секреция в кровь и лимфу) или экзокринной (секреция в отделы, сообщающиеся с внешним пространством) активностью, причем в числе секретируемых оказываются не только малые молекулы, но и полипептиды, белки и даже ферменты. Известно также, что в клетку могут проникать вирусы и бактерии. Не только при патологиях, но и при нормальном функционировании организма может происходить обмен белками и (крайне редко) нуклеиновыми кислотами между разными клетками. Этот перенос осуществляется с помощью специальных ферментных механизмов или путем пиноцитоза (эндоцитоз — вход в клетку, экзоцитоз — секреция клеткой). Пиноцитоз может участвовать и в переносе малых молекул, например некоторых нейромедиаторов и гормонов (см. раздел 2.3).

Для того чтобы протекал ферментативный процесс, необходимо постоянное поступление в активный центр фермента субстратов и удаление продуктов. В растворе скорости этих процессов определяются простыми законами диффузии: их можно ускорить или замедлить, изменяя температуру или вязкость растворителя. В клетке ферменты и субстраты могут быть разделены мембраной, и тогда любой фактор, оказывающий влияние на проницаемость мембран, может служить регулятором ферментативного процесса. Так, например, повышение проницаемости мембран митохондрий для жирных кислот под действием карнитина приводит к значительному ускорению процессов β -окисления. В ряде случаев такие регуляторы могут непосредственно связываться с субстратами или ферментом и тем самым изменять их компартиментализацию, а в ряде случаев регулятор может взаимодействовать с другими структурами клетки и, изменяя проницаемость для субстратов или продуктов, вызывать «дистанционную» регуляцию ферментативных процессов. К числу последних могут относиться как внутриклеточные метаболиты (например, жирные кислоты, изменяя проницаемость мембран митохондрий для H^+ и Ca^{2+} , могут влиять на сопряжение дыхания с фосфорилированием), так и специфические регуляторы, например, гормоны и медиаторы.

Рассматривая обратимую реакцию $S \rightleftharpoons P$ (см. раз-

дел 1.1), мы пришли к заключению, что при определенных концентрациях S и P будет достигаться равновесие: скорость реакции $S \rightarrow P$ будет равна скорости реакции $P \rightarrow S$. Однако в клетке далеко не всегда достигается равновесие между компонентами обратимой реакции, подчиняющееся уравнению Холдейна, поскольку продукт обратимой реакции, как правило, может превращаться под действием других ферментов, в том числе и таких, которые катализируют необратимые реакции. В качестве примера можно привести обратимую реакцию между 3-фосфоглицериновым альдегидом и фосфодиоксиацетоном, равновесие в которой сильно сдвинуто в сторону образования последнего соединения, однако постоянное использование 3-фосфоглицеринового альдегида в процессах гликолитической оксидоредукции приводит к сдвигу обратимой реакции в сторону превращения фосфодиоксиацетона в 3-фосфоглицериновый альдегид.

Не менее важное значение может иметь и удаление продукта необратимой реакции, если этот продукт в состоянии конкурировать с субстратом за фермент. Во многих случаях мы можем наблюдать, что такое удаление происходит не только путем последовательного превращения вещества другими ферментами, но и путем пространственного удаления его от фермента. Так, например, малат и цитрат могут покидать митохондрии и тем самым изменять как энергетические процессы цитоплазмы, так и активность цикла Кребса (рис. 14). Отметим, что выход метаболитов из митохондрий — также регулируемый процесс.

Известно, что инсулин увеличивает проницаемость наружных мембран ряда тканей для глюкозы, других метаболитов, ионов. Этот процесс опосредуется сложными внутримембранными процессами (см. раздел 4.1), связанными, по-видимому, с изменением состояния переносчиков в мембране. Подобными эффектами и подобным механизмом действия обладают также соматомедины, которые, вероятно, опосредуют влияние гормона роста на рост костной и мышечной тканей. Инсулин и соматомедины, по-видимому, не проникают в клетку, а взаимодействуют с мембранными рецепторами и тем самым стимулируют процессы химической модификации белков — их фосфорилирование, гидроксилирование и сульфирование (см. раздел 1.3). Следствием такой

модификации является изменение проницаемости мембран для ионов и метаболитов, а также усиление синтеза белка. Поскольку активный транспорт метаболитов в клетках животных происходит, как уже отмечалось, за счет энергии ионных градиентов, эффекты инсулина и соматомединов зависят от активности Na^+ -насоса и пассивной проницаемости мембран для ионов.

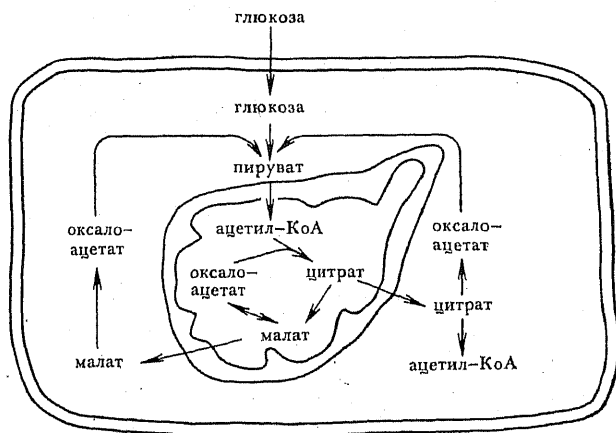


Рис. 14. Превращения метаболитов в клетке и их транспорт через цитоплазматическую и митохондриальные мембраны

Существенное влияние на проницаемость мембран для ионов оказывают гормоны и нейромедиаторы, повышающие концентрацию цАМФ в клетке. К их числу принадлежат катехоламины (в случае связывания с β -адренергическими или дофаминергическими рецепторами), глюкагон, паратгормон, кальцитонин, либерины, тропины и др. (см. раздел 1.3). Связываясь с мембранными рецепторами, они активируют аденилатциклазу (см. раздел 4.2.1), в результате чего в клетке возрастает концентрация цАМФ и происходит цАМФ-зависимое фосфорилирование белков (см. раздел 4.2.4). При цАМФ-зависимом фосфорилировании мембран может возрастать проницаемость плазматических мембран для Ca^{2+} , активироваться Na^+ , K^+ -АТФаза (скорость активного транспорта Na^+ и K^+) и Ca^{2+} -АТФаза эндоплазма-

тического ретикулума (активный транспорт Ca^{2+} во внутриклеточные «депо»).

Эффекты антидиуретического гормона (см. раздел 4.1) на проницаемость мембран для воды также, по-видимому, опосредуются реакциями цАМФ-зависимого фосфорилирования. Предполагается, что цАМФ-зависимое фосфорилирование микротрубочек приводит к уменьшению вязкости мембраны, в результате чего возрастает диффузия воды в просвет почечных канальцев.

Альдостерон влияет на проницаемость мембран для Na^+ (см. раздел 4.1). Эффекты альдостерона можно предотвратить с помощью ингибиторов синтеза белка. Возможно, этот гормон индуцирует синтез компонентов Na^+ -насоса или других мембранных белков, либо непосредственно участвующих в транспорте Na^+ , либо регулирующих этот процесс.

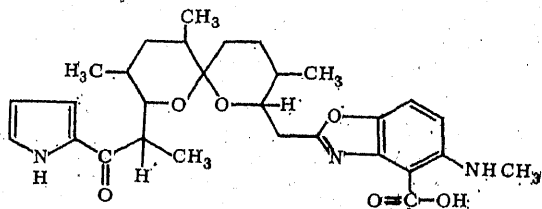
Катехоламины, связываясь с α -адренергическими рецепторами, а также ацетилхолин, ангиотензин, простагландины группы F и ряд других специфических регуляторов действуют на многие ткани путем увеличения проницаемости мембран для Na^+ или Ca^{2+} . Эффекты этих регуляторов, по-видимому, не связаны с процессами химической модификации белков и не затрагивают процессов индукции и репрессии синтеза белка. Предполагается, что эти гормоны и нейромедиаторы связываются с рецепторами, расположенными в плазматической мембране клетки, и открывают «каналы» пассивного транспорта ионов (см. раздел 4.1). Возможно, рецепторы этих регуляторов функционально связаны с ионными «каналами». Существуют данные в пользу того, что, по крайней мере некоторые мембранные рецепторы непосредственно формируют в мембране «каналы» для ионов. При связывании нейромедиатора или гормона такой рецептор претерпевает изменения, которые приводят к открыванию «канала» (см. раздел 4.1).

Все эти регуляторы изменяют проницаемость мембран не для метаболитов, а для ионов, которые могут служить кофакторами ферментов, а также изменять электрохимические потенциалы на мембране клетки.

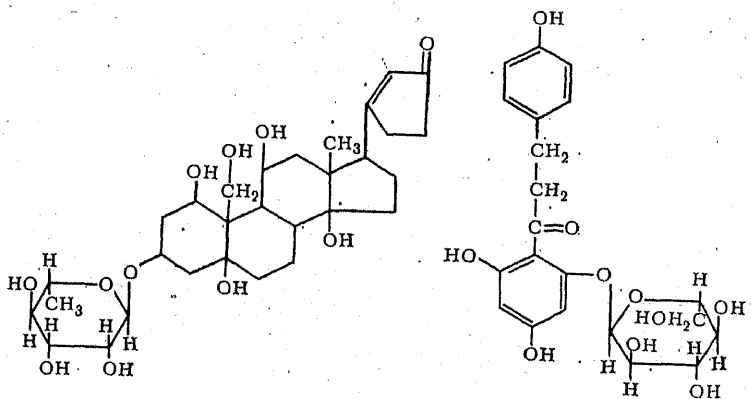
Перечисленные выше гормоны и медиаторы обладают существенно разной химической природой. Инсулин и соматомедин — полипептиды, антидиуретический гормон и ангиотензин — пептиды, ацетилхолин и кате-

холамины — низкомолекулярные соединения, альдостерон — стероид. Механизмы их действия, как мы видели, также различны. Тем не менее, все эти агенты можно объединить в одну группу по общему признаку, присущему им: биологические эффекты данных регуляторов осуществляются путем воздействия на компартиментализацию веществ в клетке или перераспределение веществ между клетками.

Знание основных механизмов и принципов регуляции в клетке облегчает задачу выяснения пути, по которому оказывает свое действие то или иное биологи-



ионофор Ca^{2+} A23187



уабанин

флоридзин

чески активное вещество. Облегчается также поиск регуляторов биологического процесса. В случае процессов, связанных с изменением компартиментализации веществ, большую пользу могут оказывать ионофоры, которые избирательно повышают проницаемость мембран для Ca^{2+} или Na^+ . Ингибиторы активного транспорта

веществ (например, флоридзин, подавляющий транспорт сахаров, или убаин, ингибирующий активный транспорт Na^+) являются удобными инструментами в изучении механизма действия гормонов, влияющих на транспортные процессы (например, инсулина и соматомединов).

1.3.

ХИМИЧЕСКАЯ МОДИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ

В разделе 1.1 мы рассматривали процессы регуляции, которые осуществляются путем нековалентного связывания регулятора с белком. Такое связывание происходит за счет электростатического и гидрофобного

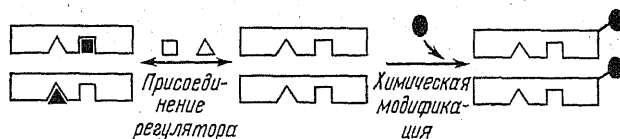


Рис. 15. Два способа изменения каталитической активности фермента: нековалентное присоединение регулятора (активатора и ингибитора) и ковалентное присоединение химической группы (химическая модификация белка)

взаимодействия, а также образования непрочных водородных связей между теми участками регулятора и белка, которые обладают комплементарностью друг к другу. В биологических системах широко распространен и другой способ регуляции — ковалентное присоединение химической группы (рис. 15). Типичным примером такой модификации белка является ковалентное присоединение кофакторов: биотина, рибофлавина, углеводов, липидов. Этот процесс весьма специфичен: биотин и рибофлавин связываются только с теми ферментами, которые катализируют реакции, протекающие при участии этих кофакторов. Присоединяться каждый из кофакторов может лишь к определенным аминокислотным остаткам белка. Так, например, олигосахариды присоединяются через О-гликозидную связь к ОН-группе серина или треонина либо же к амидному азоту аспарагина и глутамина. Некоторые белки мышц и мозга (гораздо реже — других тканей) подвергаются мети-

лированию. При этом в составе белков образуются N-метил-диметил- или триметиллизин, N-метил-аргинин или 3-метил-гистидин. Источником метильных групп служит S-аденозилметионин, а реакцию катализируют ферменты, получившие название метилазы.

Подобным же образом, при участии специальных ферментов и веществ, поставляющих функциональные группы, происходит ацилирование, гидроксилирование, аденилирование, уридилирование, фосфорилирование, АДФ-рибозилирование и другие модификации определенных аминокислотных остатков белка. В ряде случаев белки подвергаются химической модификации еще в процессе рибосомального синтеза. Например, синтез проколлагена на рибосомах завершается его гидроксиглированием с образованием в составе белка оксипролина и оксилизина. В большинстве случаев белки подвергаются химической модификации в процессе посттрансляционного функционирования.

Присоединение химических групп может изменять целый ряд свойств белка: устойчивость к протеолизу (следовательно, полупериод жизни), сродство к разным структурам клетки (компартаментализацию), функциональную активность (например, кинетические константы ферментов). Ряд белков может подвергаться сразу нескольким типам модификации. Гистоны, например, могут фосфорилироваться, метилироваться и ацетилироваться. Не исключено, что изменение функционального состояния гистона в хроматине достигается в результате протекания нескольких разных реакций химической модификации белка.

Поскольку химические модификации белка происходят, как правило, с участием макроэргических соединений, эти реакции термодинамически необратимы. В клетке модифицирующие группы снимаются с белка при участии специальных ферментов. Некоторые модификации белка сохраняются на несколько минут, например фосфорилирование. Другие «метят» белок на несколько часов или дней (аденилирование, ацетилирование). Такие модификации, как метилирование и гидроксиглирование, могут сохраняться в течение всей жизни белка.

Следует отметить, что модификациям путем присоединения разных функциональных групп подвергаются не только белки, но и низкомолекулярные пептиды, нук-

леиновые кислоты, полисахариды, липиды. Свойства данных полимеров при этом также изменяются. Поскольку химическая модификация биологических полимеров происходит при участии ферментов, все эти процессы регулируемы. Существует большое число гормонов и медиаторов, которые оказывают влияние на клетку путем замедления или ускорения реакций химической модификации белков, а возможно, и модификации других внутриклеточных полимеров, например фосфоинозитидов (см. раздел 4.1). Быстрым и широко распространенным способом химической модификации белков является их фосфорилирование — дефосфорилирование. Этот процесс катализируется протеинфосфокиназами и фосфопротеинфосфатазами (см. раздел 4.2.3). Донором фосфатных групп служит АТФ и, в редких случаях, ГТФ. Модификации подвергаются ОН-группы серина или треонина. В ряде клеток (в основном активно пролиферирующих) обнаруживаются и такие протеинфосфокиназы, которые катализируют фосфорилирование ОН-групп тирозина.

Протеинфосфокиназы (в последние годы их наименование упростилось — теперь их называют протеинкиназами) найдены почти во всех органеллах клетки (см. раздел 4.2.3). Обнаружено множество белковых субстратов протеинкиназ. Выделено более десятка протеинкиназ, различающихся по специфичности к белковым субстратам (или к определенным ОН-группам серина и треонина на одном и том же белке), строению, каталитическим и регуляторным свойствам.

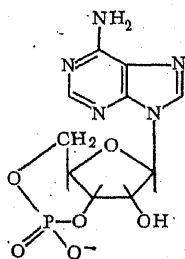
Показано влияние процессов фосфорилирования и дефосфорилирования на такие функции клеток, как пролиферация и дифференцировка, транскрипция, трансляция, метаболизм углеводов и липидов, сократительная, электрическая, секреторная активность и др.

Существует большой класс фосфопротеинфосфатаз, также различающихся по свойствам и субстратной специфичности. Очевидно, что развитие и устранение эффекта фосфорилирования будет зависеть от соотношения активностей соответствующих протеинкиназы и фосфопротеинфосфатазы, специфичных для данного белка. Не исключено, что ряд белков не может дефосфорилироваться в клетке, так как они всегда выделяются в полностью фосфорилированной форме. Напротив, ряд белков, фосфорилирование которых в клетке доказано,

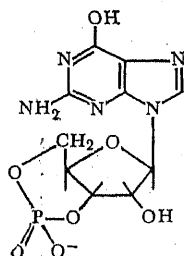
всегда выделяется в дефосфо-форме, что, вероятно, объясняется высокой активностью соответствующей фосфопротеинфосфатазы.

Далеко не всегда фосфорилирование белка, обнаруженное в опыте *in vitro*, свидетельствует о том, что этот белок может фосфорилироваться в клетке. Во-первых, показано, что денатурация белка в ряде случаев делает его субстратом протеинкиназ, а любой белок, выделенный из клетки, может быть отчасти денатурирован. Во-вторых, протеинкиназа, фосфопротеинфосфатаза и их белковые субстраты в клетке строго компартментализованы. Для каждой из протеинкиназ в опытах *in vitro* обнаружено около десятка белков, служащих субстратами фосфорилирования. В то же время, при внедрении в клетки радиоактивной АТФ удается обнаружить включение фосфата не более чем в 5—7 белков. Это означает, что фосфорилированию подвергается такое количество разных белков, которое практически равно количеству разных протеинкиназ в данной клетке.

Активность ряда протеинкиназ может регулироваться циклическими нуклеотидами (цАМФ и цГМФ) и ионами Ca^{2+} , т. е. веществами, концентрация которых в цитоплазме может изменяться в ответ на такие внекле-



циклический 3':5'-АМФ
(цАМФ)



циклический 3':5'-ГМФ
(цГМФ)

точные сигналы, как гормоны, медиаторы, свет (сетчатка глаз), электрический стимул и др. Для большого числа протеинкиназ и фосфопротеинфосфатаз регуляторы не обнаружены. Возможно, что в данном случае реакция фосфорилирования и дефосфорилирования контролируются изменением доступности субстратов для этих ферментов. Нельзя исключить также, что такое «нерегулируемое» фосфорилирование играет роль фактора, завершающего посттрансляционный переход белка в функционально активное состояние, либо определяет его компартментализацию в клетке, либо же отмечает «состарившийся» белок, ускоряя тем самым его последующую деградацию.

Рассмотрим более подробно реакции фосфорилирования, которые контролируются циклическими нуклеотидами. Эти процессы опосредуют действие на клетки большого числа гормонов и медиаторов (β -адренергических, а также многих пептидных, полипептидных и белковых). К числу специфических регуляторов, основные эффекты которых опосредуются изменением содержания циклических нуклеотидов, относятся почти все гормоны гипоталамуса и гипофиза (см. раздел 2.1), глюкагон, катехоламины (в случае действия через β -адренергические рецепторы), простагландины группы *E*. Эффекты всех этих гормонов быстрые (секунды и минуты) и обратимые. Они развиваются путем взаимодействия гормона с мембранным рецептором. Иногда наблюдается последующее проникновение гормонов в клетку, однако в большинстве случаев это не имеет отношения к его основному биологическому эффекту, а связано с деградацией гормона или же с процессами регуляции чувствительности клетки к биологически активным веществам (см. разделы 2.2 и 3.4).

Открытие циклических нуклеотидов, а затем установление механизмов их участия в передаче сигнала снаружи клетки на внутриклеточные структуры было сделано Сазерлендом при изучении процесса регуляции адреналином и глюкагоном гликогенфосфорилазы в печени. На рис. 16 показана последовательность реакций, приводящих к переходу этого фермента из низкоактивной формы фосфорилазы *b* в активную форму — фосфорилазу *a*. Гормон взаимодействует со специфическим рецептором на наружной поверхности клетки. Сигнал об этом взаимодействии передается на внутреннюю

```

graph TD
    G[гормон] --> H1[аденилатциклаза Н]
    H1 --> A1[аденилатциклаза А]
    A1 --> H2[АТФ]
    H2 --> C[циклический АМФ]
    C --> H3[протеинкиназа Н]
    H3 --> A2[протеинкиназа А]
    A2 --> H4[киназа фосфорилазы Н]
    H4 --> A3[киназа фосфорилазы А]
    A3 --> B[фосфорилаза б]
    B --> A4[фосфорилаза а]
    A4 --> G1[гликоген]
    A4 --> G2[глюкозо-1-фосфат]
  
```

гормон

аденилатциклаза (Н) аденилатциклаза (А) плазматическая мембрана

АТФ циклический АМФ

протеинкиназа (Н) протеинкиназа (А)

киназа фосфорилазы (Н) киназа фосфорилазы (А)

фосфорилаза б фосфорилаза а

гликоген глюкозо-1-фосфат

рилирования активность киназы фосфорилазы возрастает, и она, в свою очередь, фосфорилирует фосфорилазу Б. Фосфорилаза переходит из низкоактивной формы в активную. В результате этого активируется гликогенолиз.

Замечательная особенность этой каскадной системы состоит в том, что все регуляторы, участвующие в ней,

действуют при чрезвычайно низких концентрациях: гормоны и простагландины — при концентрации 10^{-10} — 10^{-8} М, цАМФ — при концентрации 10^{-7} — 10^{-6} М.

Протеинкиназы опосредуют подавляющее большинство эффектов цАМФ. Субстратами цАМФ-активируемых протеинкиназ являются самые разные белки: основные и кислые белки хроматина, сигма-фактор РНК-

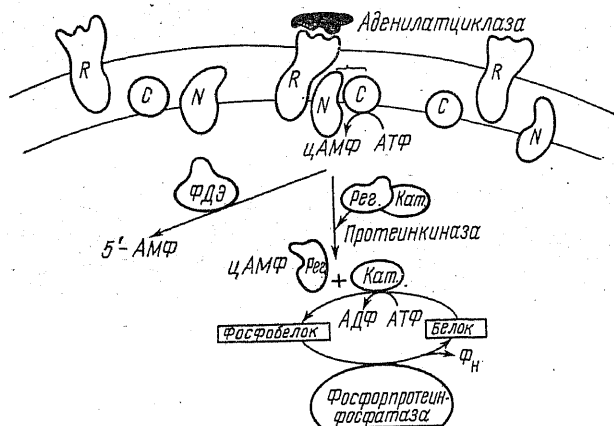


Рис. 17. Влияние гормонов (Н) на синтез циклического АМФ (цАМФ) и фосфорилирование белков: R — рецептор; C — каталитическая субъединица аденилатциклазы; N — сопрягающий фактор, передающий сигнал от R на C, ФДЭ — фосфодиэстераза, Рег. и Кат. — соответственно регуляторная и каталитическая субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы

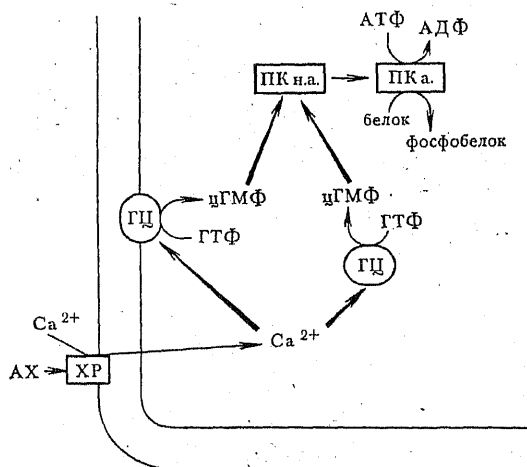
полимеразы, киназа фосфорилазы, гликогенсинтаза, пируваткиназа, тропонин, мембранные белки, контролирующие ионную проницаемость, и т. д. Фосфорилирование одних из этих белков приводит к резкому повышению их активности, а фосфорилирование других — к ее снижению.

Фосфорилирование затрагивает не только каталитическую активность ферментов, но и их регуляторные свойства. Так, например, после фосфорилирования сродство киназы фосфорилазы к ионам Ca^{2+} возрастает в 10—20 раз (см. раздел 4.2.3). Фосфорилирование сообщает гликогенсинтазе чувствительность к регулируемому действию глюкозо-6-фосфата.

Наряду с цАМФ важную роль в регуляции процессов фосфорилирования может играть цГМФ. Этот нук-

леотид образуется из ГТФ при участии гуанилатциклазы (см. раздел 4.2.1) — фермента, который находится в клетке как в растворимом, так и в связанном с мембранами состоянии. Протекание в клетке процессов, сопровождающихся образованием свободных радикалов или окислением липидов, приводит к значительной активации гуанилатциклазы. Универсальным активатором

Рис. 18. Влияние ацетилхолина (АХ) на синтез циклического ГМФ (цГМФ) и фосфорилирование белков: ХР — холинэргический рецептор, ГЦ — гуанилатциклаза, ПК_{н.а.} — неактивная, ПК_{а.} — активная форма цГМФ-зависимой протеинкиназы

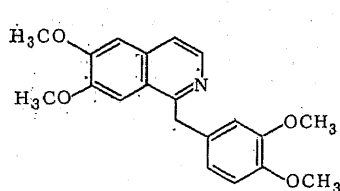


гуанилатциклазы в разных тканях является, видимо, внутриклеточный Ca^{2+} , поэтому биологически активные вещества, повышающие проницаемость мембран для Ca^{2+} (ацетилхолин, простагландины группы F), могут значительно увеличивать концентрацию цГМФ в клетках (рис. 18). Биологические эффекты цГМФ опосредуются специальным классом цГМФ-зависимых протеинкиназ (см. раздел 4.2.3). Как и в случае цАМФ-зависимого фосфорилирования, донором фосфатных групп в реакциях цГМФ-зависимого фосфорилирования является АТФ, однако белковые субстраты у этих протеинкиназ отличные (преимущественно мембранные белки) от субстратов цАМФ-зависимых протеинкиназ. Принято считать, что биологические эффекты у цГМФ и цАМФ противоположны (например, цГМФ вызывает сокращение, а цАМФ — расслабление гладких мышц), однако такая закономерность соблюдается далеко не всегда.

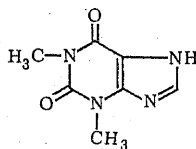
Большинство представлений о биологической роли

цГМФ скорее гипотетично, чем экспериментально обосновано. Отметим также, что в ряде клеток (главным образом в культурах тканей) обнаружены другие циклические нуклеотиды (цИМФ и цЦМФ), роль которых остается неизвестной.

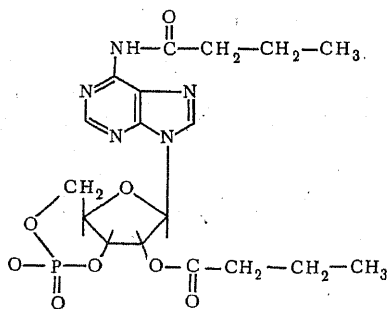
Знакомство с принципами функционирования ферментного каскада, осуществляющего фосфорилирование белков при участии циклических нуклеотидов позволяет экспериментатору определить, участвует ли интересующее его вещество (а если да, то на каком этапе) в данных процессах. Для установления механизма действия определенного химического агента существенное значение может иметь применение дибутирильного аналога цАМФ — синтетического соединения, которое, в



папаверин



теофиллин



дибутирил-цАМФ

отличие от цАМФ, может проникать через биологические мембраны.

Если дибутирильный аналог цАМФ, известные активаторы аденилатциклазы и ингибиторы фосфодиэстеразы оказывают на клетку те же эффекты, что и интересующий нас агент, если данный агент может повышать

концентрацию цАМФ в клетке, а его биологический эффект блокируется ингибиторами протеинкиназ, то становится весьма вероятным предположение, что действие исследуемого вещества на клетку опосредуется образованием цАМФ и последующими реакциями цАМФ-зависимого фосфорилирования белков. Если вещество не проникает в клетку, а его эффекты значительно усиливаются ингибиторами фосфодиэстеразы (например, теofilлином или папаверином), то можно с определенной степенью вероятности утверждать (окончательный вывод можно сделать, только проведя исследование на выделенных ферментах), что данное вещество влияет на активность аденилатциклазы. Исследовав действие блокаторов гормональных рецепторов, можно установить, через какой тип рецептора вещество регулирует активность аденилатциклазы. Следует отметить, что подобные исследования (равно, как и применение ионофоров или блокаторов транспортных процессов в случае изучения механизмов регуляции мембранной проницаемости) требуют известной осторожности. Так, например, дибутирильный аналог цАМФ, проникающий внутрь клетки, — плохой активатор протеинкиназы и действует главным образом путем ингибирования внутриклеточных фосфодиэстераз, в результате чего может повышаться концентрация не только цАМФ, но и цГМФ. В случае применения теofilлина и папаверина также изменяется концентрация обоих циклических нуклеотидов, а кроме того, может повышаться проницаемость мембран для Ca^{2+} вследствие непосредственного взаимодействия этих веществ с мембраной. В ряде случаев изменение концентрации цАМФ в клетке не причина, а следствие биологического эффекта, поэтому непременным условием подобного рода исследований является также изучение кинетики повышения концентрации цАМФ в клетке и кинетики проявления изучаемого биологического процесса.

Помимо циклических нуклеотидов на реакции фосфорилирования белков могут влиять также ионы Ca^{2+} (см. раздел 4.2.3), инсулин (раздел 4.1) и ряд других биологически активных веществ. Эти активаторы действуют через протеинкиназы, нечувствительные к циклическим нуклеотидам. Во многих случаях последовательность процессов, приводящих к такой активации, не установлена. Обнаружено, что Ca^{2+} может связы-

ваться (через специальный регуляторный белок — кальмодулин) с целым рядом мембранных и растворимых протеинкиназ (раздел 4.2.3).

Стимуляция процессов фосфорилирования может происходить также под действием факторов, индуцирующих синтез протеинкиназ. Так, например, при трансформации клеток саркомы в десятки раз повышается содержание протеинкиназ, вследствие чего значительно растет количество фосфобелков в этих клетках.

Важным регуляторным механизмом, который также осуществляется путем модификации полимеров, является их избирательное расщепление на фрагменты. По-видимому, все типы РНК могут синтезироваться в виде больших молекул, а затем расщепляться нуклеазами. Некоторые фрагменты разрушаются, а другие, сшитые специальными ферментами, формируют завершенную структуру РНК. Предполагается, что подобные модификации претерпевает и ДНК.

К подобному принципу регуляции относится также ограниченный протеолиз белков. Многие ферменты синтезируются в виде проферментов, которые переходят в каталитически активное состояние только после отщепления от них фрагмента полипептидной цепи. Это может позволять клетке быстро и без дополнительного усиления процессов транскрипции или трансляции увеличивать концентрацию активного белка в ответ на поступивший регуляторный сигнал. Существует также точка зрения, согласно которой синтез белка большего молекулярного веса необходим для формирования определенной третичной структуры. После образования водородных и сульфгидрильных связей, закрепляющих эту структуру, часть полипептидной цепи становится «ненужной» и она выщепляется протеазами.

Ограниченный протеолиз белков в клетке — необратимый регуляторный процесс. Он играет важную роль в секреции белков или дифференцировке клеток, так как «память» о прошедшей модификации сохраняется на все время жизни данного белка (несколько часов, дней или даже месяцев). Малообратимые процессы химической модификации белков (метилирование, гидроксилирование и др.) могут нести информацию о продолжительности жизни белка (новый или старый), определять его локализацию в клетке, влиять на взаимодействие с другими белками или нуклеиновыми кислотами

и т. д., но вряд ли они являются посредниками в действии на клетку таких регуляторов, эффекты которых быстро развиваются и быстро исчезают (нервная и гормональная регуляция). Следует, однако, оговориться, что продолжительное нейрогуморальное воздействие может приводить к специализации клеток, изменению их морфологии и ряда функциональных свойств, например вызывать переход мышцы из тонической в тетаническую. Такие эффекты нейрогуморальной системы развиваются медленно (часы, дни) и столь же медленно исчезают (при устранении нейрогуморальной регуляции). Не исключено, что подобные регуляторные эффекты развиваются с участием процессов необратимой или малообратимой модификации белков.

Из всех реакций химической модификации белков пути регуляции установлены лишь для процессов фосфорилирования. По-видимому, существуют биологически активные вещества, которые действуют на клетку путем метилирования, ацетилирования, аденилирования и других модификаций белка. Возможно, что существуют также внутриклеточные регуляторы этих реакций, выполняющие роль, подобную роли циклических нуклеотидов в процессах фосфорилирования. Нельзя, однако, исключить и того, что регуляция этих реакций опосредуется фосфорилированием ферментов, осуществляющих метилирование, аденилирование, ацетилирование и т. п., или же фосфорилированием белковых субстратов метилаз, ацетилаз и т. д. Так, показано, что повышение концентрации цАМФ в мышечном волокне может приводить к ускорению метилирования белков. Подобные эффекты цАМФ обнаружены и для реакций ацетилирования, а в составе АДФ-рибозилтрансферазы обнаружен ковалентно связанный фосфат. В этой связи следует отметить, что цАМФ стабилизирует, а цГМФ дестабилизирует мембраны лизосом, служащих основным источником внутриклеточных протеаз. Действуя на лизосомы, циклические нуклеотиды, вероятно, могут ускорять или замедлять процессинг белков.

1.4.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОМА

Материалы, из которых построена живая клетка (белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и липиды), нуждаются в постоянном обновлении. Характерно, что

скорость такого обновления «запрограммирована» в генетическом материале самой клетки. Как правило, она обратно пропорциональна продолжительности жизни организмов: у моркови белки расщепляются и вновь синтезируются в сотни раз быстрее, чем у секвойи, а у лягушки — быстрее, чем у крокодила.

Синтез белков зависит от активности соответствующих генов (транскрипция), устойчивости матричной РНК (у прокариотов полупериод ее жизни составляет несколько минут, а у эукариотов — несколько часов и даже дней), количества и функциональной активности рибосом. Скорость деградации белка определяется прежде всего его природой. Есть белки, которые (благодаря своей структуре или локализации в клетке) могут функционировать в течение нескольких недель и месяцев. Другие оказываются очень хорошими субстратами протеаз и поэтому живут лишь десятки минут или несколько часов.

Какие же пути регуляции содержания белка реализуются в клетке? Прежде всего, индукция и репрессия синтеза, которая заключается в изменении скорости транскрипции соответствующего гена. Как правило, активно функционирующий ген может «умножаться». Образование в молекуле ДНК нескольких одинаковых генов — один из путей ускорения транскрипции.

Синтез мРНК зависит от активности ДНК-зависимой РНК-полимеразы, а поэтому любые факторы, влияющие на «число мест связывания» этого фермента на ДНК или на его каталитическую активность, могут быть эффективными регуляторами транскрипции. Посттранскрипционная модификация мРНК, а также доступность мРНК для нуклеаз, инактивирующих этот полимер, выход из ядра и связывание с рибосомами, образование полисом — все это процессы, чувствительные к многочисленным внутриклеточным факторам.

Экспериментально наиболее обоснована модель индукции и репрессии синтеза белка, предложенная Жакобом и Моно. В основе этой модели лежат экспериментальные данные, полученные при изучении клеток *E. coli*. Механическое перенесение закономерностей, обнаруженных на этом объекте, на клетки эукариотов вряд ли оправданно, поскольку у них структура хроматина и регуляторные механизмы имеют ряд специфических отличий.

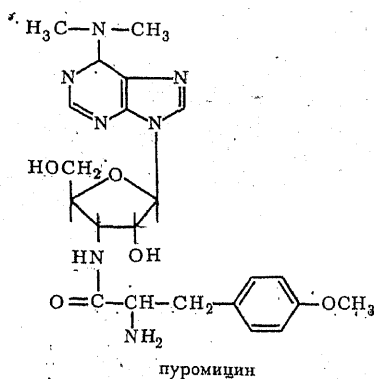
Обычно клетки *E. coli* не в состоянии потреблять лактозу, так как в них отсутствуют ферменты, участвующие в метаболизме галактозидов (β -галактозидаза, пермеаза лактозы и трансацетилаза). Спустя 2 мин после перенесения таких клеток из среды с глюкозой на среду с лактозой в клетках начинается синтез ферментов, нужных для метаболизма лактозы. Образование этих ферментов под действием лактозы объясняется следующим образом. В хромосоме *E. coli* есть три гена, кодирующих структуру данных ферментов. Эти структурные гены включаются геном-оператором. Функционирование гена-оператора находится под контролем репрессора и индуктора. Репрессор — это белок, состоящий из четырех субъединиц, каждая из которых имеет молекулярный вес 37 000. Структура репрессора закодирована на гене-регуляторе. В молекуле репрессора есть два специфических участка. Одним из них он связывается с определенной нуклеотидной последовательностью ДНК на гене-операторе и тем самым блокирует транскрипцию структурных генов. Другой участок может связывать низкомолекулярное вещество, называемое индуктором. В случае лак-оперона индуктором служит лактоза. Связывание индуктора переводит репрессор в неактивную форму, он диссоциирует от гена-оператора, и тем самым включается транскрипция структурных генов. Через несколько минут после удаления из среды лактозы происходит репрессия структурных генов, так как белок-репрессор вновь приобретает способность связываться с геном-оператором. Полупериод жизни мРНК у прокариотов, как отмечалось, составляет всего несколько минут, поэтому длительность хранения «памяти» о действии на клетку лактозы будет зависеть от того, как быстро инактивируются ферменты, участвовавшие в ее метаболизме. На клетках *E. coli* данный регуляторный сигнал развивается в течение нескольких минут, а гасится в течение десятков минут.

Иницирующее действие субстратов на образование соответствующих ферментов можно наблюдать и у животных. Так, например, обогащение пищи полисахаридами приводит к ускорению синтеза амилазы. Большие количества глюкозы индуцируют образование глюкокиназы, а фруктоза индуцирует фруктокиназу, альдолазу и глицеральдегидфосфаткиназу. Пища, обогащенная белками, ускоряет синтез химотрипсина и трипсиноге-

на. Подобные процессы индукции у животных развиваются медленно (в течение нескольких дней или недель) и сопровождаются слабо выраженными эффектами (активность ферментов повышается, как правило, не более чем в 2 раза).

Удобными инструментами в изучении процессов индукции и репрессии синтеза белков являются антибиотики, из которых наиболее частое применение находят актиномицин Д — блокатор транскрипции и пуромицин — блокатор трансляции. Актиномицин Д проникает в клетку и связывается с двухцепочечной ДНК в участках, содержащих гуаниновые основания. Такое связывание приводит к ингибированию полимераз, причем РНК-полимераза подавляется в значительно большей степени, чем ДНК-полимераза. Актиномицин Д подавляет синтез рибосомальной, транспортной и матричной РНК, однако первые две формы РНК — «долгоживущие», поэтому биологический эффект, опосредованный ингибированием их синтеза, проявится значительно позже, чем эффект, опосредованный блокированием транскрипции мРНК.

Пуромицин по своей структуре напоминает аминоксил-тРНК, поэтому он может конкурентно замещать



последнюю в процессах трансляции: пептидил-тРНК + пуромицин → пептидил-пуромицин + тРНК. В результате такой реакции пуромицин становится С-концевым остатком пептидной цепи. Поскольку он не содержит тРНК, необходимой для связывания пептида с рибосомой, подобное замещение прерывает дальнейший рост

пептидной цепи и приводит к ее отделению от рибосомы.

Отметим, что с помощью набора разных антибиотиков удается останавливать белковый синтез на самых разных этапах, что, в частности, позволяет точно локализовать место действия того или иного регулятора. Пактамицин ингибирует инициацию белкового синтеза, тетрациклин и стрептомицин подавляет процессы элонгации пептидной цепи, хлорамфеникол ингибирует пептидилтрансферазу, а эритромицин — рибосомальную транслоказу.

Применение антибиотиков в биологических экспериментах требует большой осторожности, так как эти вещества подавляют общий белковый синтез, что может приводить к так называемым «неспецифическим» эффектам. В комплексе с субстратом фермент наиболее устойчив к различным инактивирующим воздействиям, поэтому субстрат может регулировать не только синтез, но и деградацию белка.

В примерах, приведенных выше, доказано, что субстраты действуют на синтез белка на уровне транскрипции. Известны и примеры регуляции процессов трансляции в клетках эукариотов. Так, например, индукция синтеза гемоглобина железом (кофактором этого белка) происходит в ретикулоцитах, лишенных ДНК. Этот процесс не чувствителен к актиномицину *D* и подавляется пурамицином.

Индукция субстратом типична для одноклеточных. В многоклеточных организмах такой механизм регуляции встречается сравнительно редко. Роль индукторов у животных выполняют в основном специфические регуляторы (стероидные и тиреоидные гормоны). Все основные эффекты этих гормонов подавляются актиномицином *D*, что свидетельствует об их влиянии на процессы транскрипции.

Более подробно механизмы действия стероидных и тиреоидных гормонов будут рассмотрены в разделе 4.3, а сейчас отметим, что оба типа гормонов имеют внутриклеточные рецепторы и могут проникать в цитоплазму, а затем в ядро. Рецептор тиреоидных гормонов — белок хроматина. Его можно перевести в растворимое состояние, обработав хромосомы ДНКазой. Рецепторы стероидных гормонов локализованы в цитоплазме и только после связывания гормона приобретают способность

переходить в ядро и связываться с хроматином (рис. 19). Появление в составе хроматина гормон-рецепторного комплекса индуцирует транскрипцию мРНК. Это происходит, по-видимому, за счет изменения структуры хроматина, так как параллельно наблюдается значительное возрастание участков связывания для ДНК-зависи-

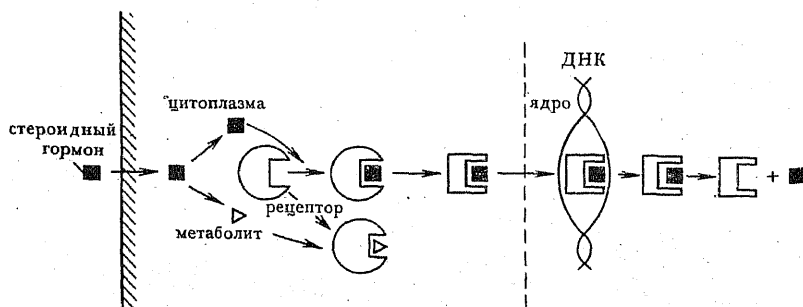


Рис. 19. Действие стероидного гормона на клетку

мой РНК-полимеразы. И тиреоидные, и стероидные гормоны могут быть не только индуктором, но и репрессорами синтеза белка. На рис. 20 изображена модель гормонзависимой индукции синтеза белка. Гормональный индуктор может переводить в активное состояние несколько структурных генов, находящихся под контролем одного и того же гена-оператора.

На рис. 21 показана репрессия синтеза белка стероидными или тиреоидными гормонами. При этом предполагается, что апорепрессор не активен. При связывании гормона (вернее, гормон-рецепторного комплекса) образуется холорепрессор, который может взаимодействовать с геном-оператором и тем самым подавлять транскрипцию нескольких структурных генов.

В настоящее время существуют методы одновременного анализа около 1000 разных белков из одной и той же ткани (например, двухмерное разделение по электрофоретической подвижности и изоэлектрическим точкам). Обработка клеток-мишеней стероидными или тиреоидными гормонами и последующий анализ качественного и количественного состава белков показывают, что в одной и той же клетке индукции или репрессии подвергается, как правило, 5—7 белков. Таким об-

разом, подавляющее количество белков в клетке не подвержено регуляции со стороны гормональных индукторов или репрессоров.

Белки, синтез которых не зависит от концентраций субстратов или продуктов реакции, а также не изменяется под действием специфических регуляторов, называ-

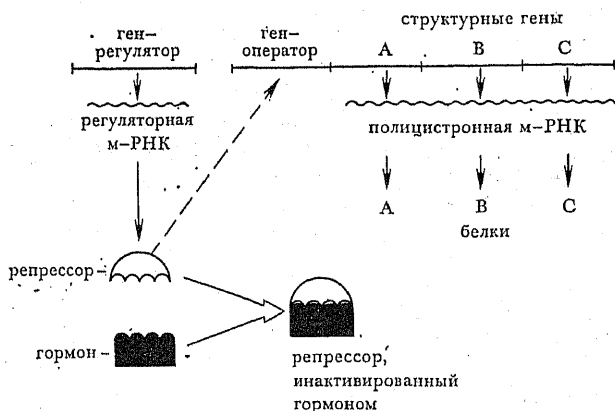


Рис. 20. Гипотетическая модель индукции синтеза белков под действием гормонов

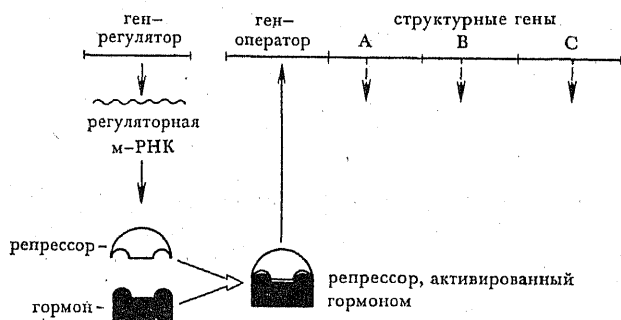


Рис. 21. Гипотетическая модель репрессии синтеза белков под действием гормонов

ют конститутивными. Концентрация таких белков в клетке определяется полупериодом жизни мРНК, скоростью трансляции и стабильностью самих белков. Белки, содержание которых может регулироваться путем изменения активности генов, называют индуцибельными.

Как уже отмечалось, в тканях животных основными индукторами и репрессорами являются стероидные и тиреоидные гормоны. Гормональная регуляция не обладает триггерными свойствами, т. е. она не «включает» и не «выключает» определенные функции, а только усиливает или ослабляет их. В соответствии с этим можно с уверенностью утверждать, что индукторы усиливают, а не «включают» синтез белка, а репрессоры подавляют его, а не «выключают» вовсе. Как совместить это ут-

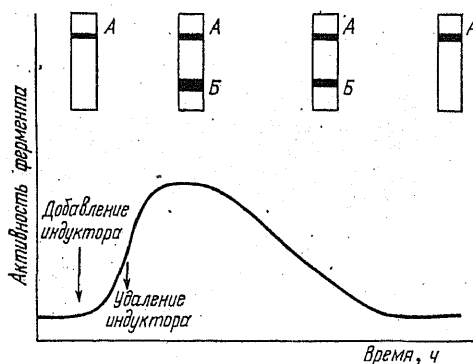


Рис. 22. Повышение активности фермента в клетке за счет индукции синтеза индуцибельной изоформы Б и снижение активности фермента к исходному уровню за счет протеолиза этой изоформы. Содержание неиндуцибельной изоформы А в течение всего времени остается неизменным (верхняя часть рисунка)

верждение с моделями индукции и репрессии, в которых регулятор выступает в роли «включателя» или «выключателя» процесса транскрипции? Оказывается, что многие индуцибельные белки могут существовать в виде изоформ. Синтез конститутивной изоформы происходит с постоянной скоростью, не зависит от индукторов или репрессоров и, таким образом, обеспечивает определенный уровень активности этого фермента в клетке. Индуктор, по-видимому, включает ген, в котором закодирована индуцибельная изоформа белка, в результате чего в клетке появляются две изоформы одного и того же белка, несколько различающиеся по свойствам.

По данным Р. И. Салганика и других авторов, индуцибельная форма фермента менее устойчива к протеолизу. После прекращения индукции эта изоформа быстро разрушается внутриклеточными протеазами (рис. 22). Тем самым достигается «гашение» гормонального сигнала, возвращение клетки в исходное функциональное состояние, определяющееся содержанием и активностью

конститутивной формы фермента. Таким образом, под контролем индуктора находится не только синтез, но и деградация белка.

Предполагается, что белки, содержание которых контролируется путем репрессии синтеза, постоянно образуются в клетке в виде двух изоформ. Репрессор подавляет синтез одной из изоформ и не влияет на процессы транскрипции и трансляции другой.

Наиболее эффективна регуляция первого этапа в цепи реакций. В предыдущих разделах мы говорили о том, что ферменты, стоящие в начале метаболических путей, находятся, как правило, под контролем нескольких регуляторных механизмов. В белковом синтезе основные регуляторные влияния также направлены на начальный этап — процесс транскрипции. Характерно также, что под контролем гормональной индукции или репрессии находятся в основном ключевые ферменты или их регуляторные белки.

Индукция синтеза фермента, происходящая под действием субстрата, приводит к активации процессов катаболизма данного вещества. Этот механизм регуляции нужен клетке либо для устранения неблагоприятного воздействия вещества (например, индукция цитохрома P_{450} и гидроксилаз в печени под действием ядов), либо для утилизации этого «чужеродного» вещества, использования его в качестве источника энергии или строительного материала.

Вещества, оказывающие репрессирующее влияние на синтез белков, как правило, образуются в той же клетке. Такие вещества накапливаются в результате реакции анаболизма. Повышение их концентрации до определенного уровня приводит к подавлению синтеза «своих» ферментов, что дает клетке возможность синтезировать другие белки или экономить метаболические ресурсы. Если возникает дефицит данного вещества, то вновь идет синтез этих ферментов. Ферменты, находящиеся под репрессорным контролем, — в основном ферменты анаболизма.

Стероидные и тиреоидные гормоны могут влиять как на катаболические, так и на анаболические процессы. В отличие от катехоламинов, пептидных, полипептидных и белковых гормонов, эффекты которых осуществляются путем изменения компартментализации вещества или химической модификации белков, а следователь-

но, могут развиваться в течение нескольких секунд или минут, эффекты стероидных и тиреоидных гормонов могут развиваться и затем исчезать в течение нескольких часов и даже дней. Это объясняется сравнительно низкой скоростью белкового синтеза, устойчивостью мРНК эукариотов и стабильностью синтезированных белков. Очевидно, что эти особенности делают стероидные и тиреоидные гормоны малоподходящими для осуществления быстрого контроля над процессами метаболизма. Кроме того, рассматриваемый способ регуляции весьма дорогостоящий, так как белковый синтез требует чрезвычайно больших затрат энергии и пластического материала клетки.

Возможно, что в силу этих причин основная функция стероидных и тиреоидных гормонов в организме сводится не к регуляции метаболических реакций, а к контролю над процессами роста, развития и дифференцировки.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Ашмарин И. П. Молекулярная биология. Л., Изд-во Ленингр. ун-та, 1977.

Бернхардт С. Структура и функции ферментов. М., Мир, 1971.

Брумберг В. А., Певзнер Л. З. Нейрохимия изоферментов. Л., Наука, 1975.

Васильев В. Ю., Гуляев Н. Н., Северин Е. С. Циклический аденозинмонофосфат — биологическая роль и механизм действия. — Журн. Всесоюз. хим. о-ва им. Д. И. Менделеева, 1975, т. 20, № 3.

Грин Д., Гольдбергер Р. Молекулярные аспекты жизни. М., Мир, 1968.

Инграм В. Биосинтез макромолекул. М., Мир, 1966.

Информационные макромолекулы / Под ред. В. А. Энгельгардта. М., Мир, 1965.

Кендрию Дж. Нить жизни. М., Мир, 1968.

Клесов А. А., Березин И. В. Ферментативный катализ. М., Изд-во Моск. ун-та, 1980.

Конев С. В., Аксенцев С. Л., Черницкий Е. А. Кооперативные переходы белков в клетке. Минск, 1970.

Корнберг А. Синтез ДНК. М., Мир, 1977.

Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. М., Мир, 1980.

Крицман М. Г., Коникова А. С. Индукция ферментов в норме и патологии. М., Медицина, 1968.

Крю Ж. Биохимия. Медицинские и биологические аспекты. М., Медицина, 1979.

Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. М., Наука, 1978.

Курский М. Д., Бакшеев Н. С. Биохимические основы механизма действия серотина. Киев, 1974.

Мецлер Д. Биохимия. Химические реакции в живой клетке. М., Мир, 1980.

Овчинников Ю. А., Иванов В. Т., Шкроб А. М. Мембрано-активные комплексоны. М., Наука, 1974.

Розен В. Б. Основы эндокринологии. М., Высшая школа, 1980.

Свенсон К., Уэбстер П. Клетка. М., Мир, 1980.

Скулачев В. П. Аккумуляция энергии в клетке. М., Наука, 1969.

Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. М., Наука, 1971.

Тасаки И. Нервное возбуждение. М., Мир, 1971.

Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э. и др. Основы биохимии. М., Мир, 1981.

Федоров Н. А. Биологическое и клиническое значение циклических нуклеотидов. М., Медицина, 1979.

Хаггис Дж., Михи Д., Мюр А. и др. Введение в молекулярную биологию. М., Мир, 1967.

Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов / Под ред. В. Н. Ореховича. М., Медицина, 1969.

Ходоров В. И. Физиология возбудимых мембран. М., Наука, 1974.

ГЛАВА 2

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ НЕЙРОГУМОРАЛЬНОЙ РЕГУЛЯЦИИ

Регуляторные сигналы сообщают клетке, что, когда и сколько она должна производить, но не могут «сказать», как это сделать. Как — «знает» сама клетка. Сродство у гормона только к определенному рецептору и наличие этого рецептора только в определенных клетках позволяет гормону сообщать, что должно произойти в целом организме. Когда — определяется временем секреции гормона, сколько — количеством секретированного гормона.

Гормоны синтезируются в эндокринных железах, т. е. тканях, протоки которых выводятся в кровеносную (главным образом в вены) или лимфатическую систему. Нейромедиаторы синтезируются в теле нейрона или в нервных окончаниях и, как правило, скапливаются в так называемых синаптических пузырьках.

Специфические регуляторы обычно образуются не тогда, когда в них возникает потребность. Они всегда (или почти всегда) есть в нужных количествах. В состоянии «покоя» идет постоянная секреция нейромедиаторов и гормонов. Эта секреция происходит спонтанно, с определенной частотой, определенными порциями. Разрыв синаптического пузырька приводит к выделению в синапс всего его содержимого. В каждом пузырьке приблизительно одинаковое количество нейромедиатора. Следовательно, за определенное время может выделиться 1, 2, 1000, но не дробное число «квантов» нейромедиатора. Катехоламины и многие белково-пептидные гормоны секретируются в кровь также определенными порциями. Это объясняется тем, что данные гормоны, подобно нейромедиаторам, секретируются путем опустошения везикул, гранул и других структур, депонирующих гормоны (см. раздел 2.3). В состоянии «покоя» секреция происходит самопроизвольно, частота «квантового» выброса гормона низка. Регуляторный сигнал, активирующий эндокринную железу, не влияет на величину «квантов», но увеличивает их частоту.

Ингибирующее влияние на секрецию гормона осуществляется путем снижения частоты выброса гормона из клеток эндокринной железы.

В отличие от катехоламинов и белково-пептидных гормонов, стероидные гормоны, по-видимому, не накапливаются в специальных структурах клетки, а благодаря своей липофильности свободно проходят через плазматическую мембрану эндокринной железы и попадают в кровь. Регуляция функциональной активности желез, в которых образуются стероидные гормоны, сводится лишь к ускорению или замедлению синтеза этих гормонов (см. раздел 2.2.2). Следует отметить, что факторы, стимулирующие или ингибирующие секреторную активность других желез, в большинстве случаев ускоряют или замедляют также и биосинтез, например катехоламинов и белково-пептидных гормонов (см. разделы 2.2.1 и 2.2.4).

Слабый активирующий сигнал, попадая на железу, вызывает выделение малой, сильный — большой порции гормона. Время появления гормонального эффекта определяется прежде всего тем, когда поступит сигнал на соответствующую железу внутренней секреции. Насколько будет велик эффект гормона, в значительной степени зависит от величины этого сигнала.

В ряде случаев функциональная активность железы регулируется «субстратом», на который направлено действие гормона. Так, например, глюкоза стимулирует секрецию инсулина из островков Лангерганса, а инсулин понижает концентрацию глюкозы в крови, облегчая ее транспорт в ткани, и тем самым устраняет стимулирующее влияние сахара на поджелудочную железу.

По такому же механизму осуществляется секреция паратгормона и кальцитонина в паращитовидной железе. Оба гормона влияют на концентрацию кальция и фосфата в крови. Паратгормон вызывает растворение минеральных веществ в кости и препятствует выбросу фосфата почками и кишечником, в результате чего увеличивается концентрация Ca^{2+} и фосфата в плазме крови. Кальцитонин, напротив, стимулирует поступление Ca^{2+} и фосфата из крови в кость, в результате чего концентрация Ca^{2+} и фосфата в плазме снижается. При высоких концентрациях Ca^{2+} в крови подавляется секреция паратгормона и стимулируется секреция кальцитонина. При снижении концентрации Ca^{2+} в крови уси-

ливается: секреция паратгормона и ослабляется — кальцитонина.

Эта регуляция, происходящая по механизму отрицательной обратной связи, очень эффективна для поддержания гомеостаза в организме.

Адаптация организма не может происходить с помощью только этого механизма. Так, например, кора надпочечников должна производить стероидные гормоны в ответ на голод, болезни, эмоциональное возбуждение и т. п. Для того чтобы эндокринная система могла отвечать на свет, звуки, запахи и реагировать на эмоции, должна существовать связь между эндокринными железами и нервной системой.

Наиболее простым примером подобной связи является регуляция клеток мозгового слоя надпочечников нервными волокнами. В мозговом слое надпочечников образуется адреналин и, в меньшей степени, норадреналин. Электрические сигналы, идущие по нервным волокнам, через синаптическую передачу (нейромедиатор — ацетилхолин) активируют клетки мозгового слоя надпочечников и вызывают в них синтез и секрецию катехоламинов. Однако такой способ замыкания нейроэндокринных связей — скорее исключение, чем правило. Клетки мозгового слоя надпочечников можно рассматривать как «переродившуюся» нервную ткань, а такую регуляцию — как сохранившуюся связь между нервными клетками.

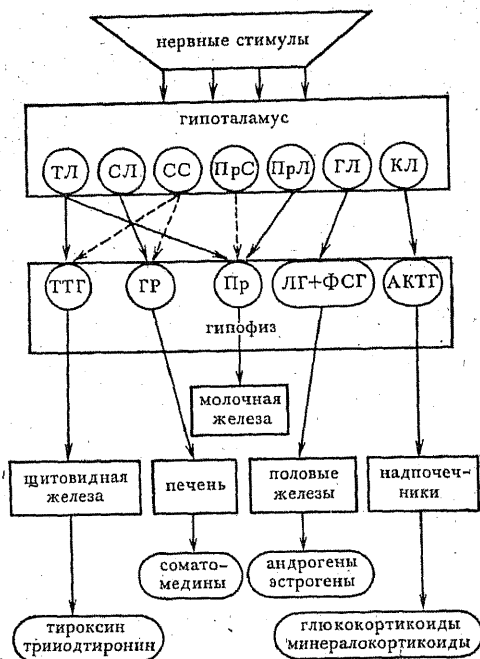
2.1.

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ СВЯЗЬ МЕЖДУ НЕРВНОЙ И ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМАМИ

Основные связи между нервной и эндокринной системами регуляции осуществляются с помощью специальных отделов мозга — гипоталамуса и гипофиза (рис. 23). В системе нейрогуморальной регуляции существует своя иерархия и строгая последовательность протекания процессов, на вершине которой находятся кора головного мозга и гипоталамус. Нервные сигналы, приходящие в гипоталамус, активируют секрецию так называемых рилизинг-факторов: тиреолиберина, соматолиберина, пролактолиберина, гонадолиберина (люлиберина) и кортиколиберина, а также соматостатина и

пролактостатина. Мишенью либеринов и статинов, секретируемых гипоталамусом, является гипофиз. Каждый из либеринов взаимодействует с определенной, «своей» популяцией клеток гипофиза и вызывает в ней синтез соответствующих тропинов: тиреотропина, соматотропина (гормона роста), пролактина, гонадотропинов (два гормона — лютеинизирующий и фолликулостимулирующий).

Рис. 23. Участие гипоталамуса и гипофиза в передаче регуляторных сигналов от нервной системы на эндокринные железы (сплошными линиями показано стимулирующее, а пунктирными — ингибирующее влияние): ТЛ — тиреолиберин, СЛ — соматолиберин, СС — соматостатин, ПрС — пролактостатин, ПрЛ — пролактолиберин, ГЛ — гонадолиберин, КЛ — кортиколиберин, ТТГ — тиреотропный гормон, ГР — гормон роста (соматотропин), Пр — пролактин (лактотропин), ЛГ — лютеинизирующий гормон, ФСГ — фолликулостимулирующий гормон (ЛГ, ФСГ — гонадотропины), АКТГ — адренокортикотропный гормон



ций), а также адренокортикотропного гормона (АКТГ). Влияние на гипофиз статинов противоположное: они подавляют секрецию тропинов.

Роль тропинов, секретируемых гипофизом, заключается в регуляции других эндокринных желез (см. рис. 23). С током крови тропины попадают на соответствующие железы и активируют в них секреторные процессы.

В этой системе передачи сигнала от центральной нервной системы до эндокринных желез (например,

надпочечников) на каждой ступени происходит увеличение количества секретируемого гормона. Как видно из рис. 24, 1 нг кортиколиберина, секретируемого гипоталамусом, может вызывать синтез и секрецию из гипофиза около 100 мкг АКТГ, который, попадая на надпочечники, будет приводить к синтезу и секреции нескольких миллиграммов стероидных гормонов. В сис-

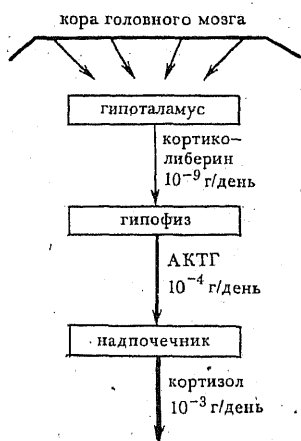


Рис. 24. Стимуляция синтеза кортизола центральной нервной системой

теме передачи сигнала от ЦНС через гипоталамус и гипофиз на «исполнительную» секреторную железу сигнал усиливается более чем в миллион раз. Последовательное участие в этом процессе нескольких эндокринных желез обеспечивает интеграцию регуляторных воздействий, так как секреторная активность каждой из этих желез зависит не только от гормональных и нервных стимулов, но и от таких факторов, как концентрация субстратов и кофакторов синтеза, состояние биосинтетического аппарата, обеспеченность энергией и т. д. Несомненно также, что многоступенчатость этой системы исключает реагирование эндокринной

системы по принципу «все или ничего», позволяет регулировать силу сигнала, усиливая или ослабляя его в зависимости от состояния и нужд организма.

Гипоталамус состоит из специализированных нервных клеток. Аксоны нейронов, локализованных в гипоталамусе, проходят через ножку гипофиза и заканчиваются на его передней доле (переднюю долю гипофиза называют также аденогипофизом). Окончания этих аксонов содержат в синаптических пузырьках либерины или статины. Возбуждение аксонов приводит к выбросу рилизинг-факторов из синаптических пузырьков. Они попадают в межклеточное пространство, а оттуда в кровеносные сосуды (гипофиз богат снабжен капиллярами, имеющими большие поры). С током крови либерины и статины попадают на клетки гипофиза. В местах

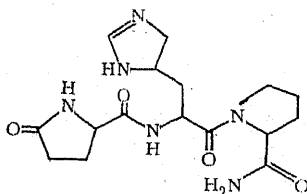
секреции релизинг-факторов есть типичная «пресинаптическая» мембрана (синаптические пузырьки в окончаниях аксонов гипоталамуса), но нет синапса, поэтому эти регуляторы можно рассматривать как гормоны, а не нейромедиаторы.

Перерезка ножки гипофиза приводит к потере связи между гипоталамусом и гипофизом. При этом секреция тиреотропного, соматотропного, гонадотропных гормонов и АКТГ понижается, а секреция пролактина возрастает.

Повреждение определенных отделов гипоталамуса приводит к исчезновению функций у определенных отделов гипофиза. Электрическое раздражение разных отделов гипоталамуса приводит к секреции из гипофиза разных тропинов. Так, например, задний отдел гипоталамуса стимулирует в гипофизе секрецию АКТГ, а передний — секрецию тиреотропного гормона. Показана также неоднородность клеток аденогипофиза. Разные тропины синтезируются в разных участках аденогипофиза. Эти участки различаются также типами рецепторов для либеринов и статинов.

Гормоны гипоталамуса и гипофиза — это в основном пептиды, полипептиды и белки. Полупериод их жизни в крови 2—5 мин.

Самый большой из либеринов — соматолиберин, состоящий из 15 аминокислотных остатков, самый маленький — трипептид тиреолиберин. В качестве релизинг-факторов выступают также гипоталамический дофамин и норадреналин.



тиреолиберин
(L-пирроглутамил-L-гистидил-L-пролин)

Разные тропины, образующиеся в гипофизе, содержат от 13 до 198 аминокислотных остатков (табл. 1). Лютеинизирующий, фолликулостимулирующий гормоны и тиреотропин — гликопротеиды, состоящие из двух разных субъединиц. За связывание с рецептором и проявление биологического эффекта гормона ответственна β -субъединица. α -Субъединица у всех трех гормонов,

Т а б л и ц а 1
Свойства белковых гормонов аденогипофиза человека

Гормон	Молекулярный вес	Субъединицы	Аминокислотные остатки	Углеродные остатки	Примечания
Гормон роста	22 000	1	191	0	Имеют 45 % сходных аминокислотных последовательностей
Пролактин	23 000	1	198	0	
Лютеинизирующий	30 000	2	α —89 β —115	16 7	Биологической активностью обладает β -субъединица; α -субъединицы близки по структуре и могут замещать друг друга без нарушения процессов связывания с рецептором и проявления биологических эффектов гормонов
Фолликулостимулирующий	32 000	2	α —89 β —115	26	
Тиреотропин	28 000	2	α —89 β —112	14 6	
АКТГ	4 500	1	39	0	Все имеют общую последовательность: мет-глу-гис-фен-арг-три-гли; образуются из общего белкового предшественника (проопиокортина)
α -Меланоцитстимулирующий	1 650	1	13	0	
β -Меланоцитстимулирующий	2 100	1	18	0	
β -Липотропин	9 500	1	91	0	
γ -Липотропин	5 800	1	58	0	

по-видимому, идентична. Основная ее роль сводится к защите β -субъединицы от протеаз.

Изучение механизмов действия гормонов, участвующих в замыкании нейрогуморальных связей (либеринов, статинов и тропинов), показало, что их основные эффекты опосредуются изменением концентрации циклических нуклеотидов. Эффекты же гормонов, образование и секреция которых находится под контролем тропинов (см. рис. 23), осуществляются главным образом путем изменения проницаемости мембран (соматомедины) или скорости синтеза белка (тиреоидные и стероидные гормоны).

По образному выражению В. П. Скулачева, нейроэндокринная регуляция осуществляется по принципу

«демократического централизма». Кроме регуляторных сигналов, идущих «сверху вниз», существует регуляция гипофиза и гипоталамуса гормонами «исполнительных» желез. Характерно, что гипоталамус, находящийся на иерархической лестнице над гипофизом, более чувствителен к гуморальной регуляции, чем гипофиз. Поэтому обратная связь в этой регуляторной системе замыкается главным образом через гипоталамус. Эти «обратные» сигналы трансформируются в гипоталамусе, передаются на гипофиз и изменяют секрецию соответствующих тропинов.

Так, например, кортикостероиды (см. рис. 23) подавляют синтез и секрецию АКТГ, тироксин — синтез тиреотропного гормона, эстрогены (женские половые гормоны) — секрецию гонадотропинов. Общей является следующая закономерность: после удаления железы стимулируется секреция соответствующего тропного гормона, при гиперфункции железы секреция соответствующего тропина подавляется.

Эта обратная связь не только позволяет осуществлять тонкую регуляцию концентрации гормонов в крови, но и участвует в дифференцировке гипоталамуса. Образование половых гормонов в женском организме происходит циклически. Эта цикличность объясняется циклической секрецией гонадотропных гормонов. Под действием фолликулостимулирующего гормона происходит развитие фолликулов. Затем секретируется лютеинизирующий гормон, который вызывает образование желтого тела — временной эндокринной железы, производящей эстрогены. Причина циклической секреции гонадотропинов кроется не в гипофизе, который синтезирует эти гормоны, а в гипоталамусе, образующем рилизинг-фактор этих тропинов (гонадолиберин). Если самке пересадить гипофиз самца, он тоже начинает работать циклично. Половая дифференцировка гипоталамуса происходит под действием андрогенов. Если самца лишить этих половых гормонов, то гипоталамус будет дифференцироваться по женскому типу.

Активность гипоталамуса контролируется также эпифизом. Эпифиз — это «часы» организма. Многие ферментные и секреторные процессы в нем протекают с циклическостью, равной световому и темновому периодам суток.

Кванты света, попадая на свой рецептор — родоп-

син, локализованный в наружных сегментах палочек сетчатки, вызывают возникновение потенциала действия, который распространяется по зрительному нерву и, в частности, активирует нервные волокна, иннервирующие эпифиз. Через эти волокна осуществляется торможение синтеза белка в эпифизе, в том числе

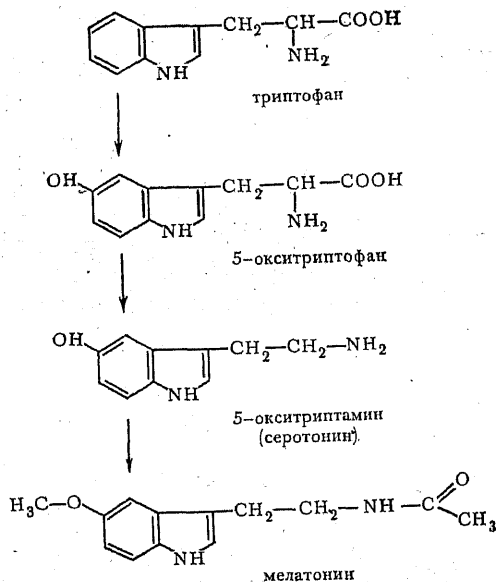


Рис. 25. Биосинтез серотонина и мелатонина

метилазы, участвующей в образовании мелатонина (рис. 25). В темное время суток растет концентрация метилазы, и поэтому образуется большее количество мелатонина. Этот гормон участвует в регуляции окраски кожи (вызывает ее просветление), подавляет эффекты гонадотропинов и влияет на секрецию релизинг-факторов в гипоталамусе.

Мелатонин образуется только в эпифизе. В других тканях (нейроны, слизистая желудка и кишечника, тучные клетки, печень и почки) гидроксилирование и декарбоксилирование триптофана приводит к образованию серотонина (5-окситриптамина) (см. рис. 25). Это нейромедиатор или гормон, который регулирует

функции многих клеток. В эпифизе серотонин является промежуточным веществом биосинтеза мелатонина. Свет, подавляя активность метилазы в эпифизе, замедляет превращение серотонина в мелатонин. Кроме того, сигнал от зрительных клеток на эпифиз передается через нервные волокна, которые секретируют катехоламины. При этом, в частности, повышается концентрация цАМФ, внутриклеточного регулятора, стимулирующего ферменты синтеза серотонина из триптофана, но не влияющего на активность метилаз. В результате всех этих процессов в светлое время суток в эпифизе повышена концентрация серотонина, а в темное время — мелатонина. Существует мнение, что имеется также «сезонная» и «годовая» циклическая активность эпифиза. Очевидно, что, воздействуя на гипоталамус, гормоны эпифиза могут задавать цикличность многим другим железам. Так, например, в темное время суток секреция пролактина выше, чем в светлое время. Это не связано со сном или бодрствованием организма. Показано также, что нарушения в циклической активности эпифиза, происходящие при частой перемене временных поясов или при экспериментальном изменении длительности «дня» и «ночи», могут приводить к нарушениям циклической секреции гонадотропинов и половых гормонов.

По-видимому, в организме имеются лишь три эндокринные железы, функциональная активность которых находится под прямым контролем нервных механизмов регуляции: мозговой слой надпочечников, о котором мы говорили в начале этой главы, эпифиз и гипоталамус. Все остальные железы находятся под гуморальным контролем. В таких железах иннервированы только сосуды (так называемая вазомоторная регуляция), а эндокринные клетки изменяют свою биосинтетическую и секреторную активность лишь под действием определенных метаболитов, кофакторов и гормонов, поступающих к ним с током крови и лимфы. Следует отметить, что помимо тропинов регуляторами эндокринных желез могут быть и другие гормоны. Так, например, глюкагон стимулирует секрецию инсулина, а инсулин — секрецию катехоламинов, ангиотензин-II стимулирует синтез и секрецию альдостерона. Отметим также, что некоторые гормоны гипоталамуса и гипофиза могут образовываться и в других тканях и там выполнять

свои специфические функции. Так, соматостатин — гормон гипоталамуса, ингибирующий образование и секрецию гормона роста, — обнаружен также в поджелудочной железе, где он подавляет секрецию инсулина и глюкагона.

Эти примеры ни в коей мере не умаляют значения гипоталамо-гипофизарного механизма регуляции. Подавляющее большинство нервных и гуморальных путей регуляции сходится на уровне гипоталамуса, и благодаря этому в организме образуется единая нейроэндокринная регуляторная система. К клеткам гипоталамуса подходят аксоны нейронов, расположенных в коре больших полушарий, в спинном, продолговатом и среднем мозге, таламусе и т. д. Эти аксоны секретируют норадреналин, дофамин, серотонин и другие нейромедиаторы, оказывающие на секреторную активность гипоталамуса как активирующее, так и ингибирующее влияние. Как отмечалось выше, на гипоталамус влияют многие гуморальные факторы. Поступающие из мозга нервные импульсы эта железа превращает в эндокринные стимулы, которые могут быть усилены или ослаблены в зависимости от гуморальных сигналов, поступающих на гипоталамус от желез, ему подчиненных.

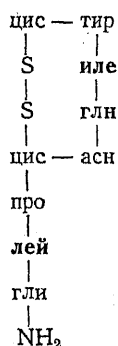
Нельзя не отметить и уникальной роли гипофиза в нейрогуморальной регуляции. Тропины, образующиеся в гипофизе, не только регулируют подчиненные железы, но и имеют самостоятельные эндокринные эффекты. Так, например, помимо регуляции образования молока, пролактин тормозит процессы дифференцировки клеток, повышает чувствительность половых желез к гонадотропинам, стимулирует родительский инстинкт. АКТГ — не только стимулятор стероидогенеза, но и важный регулятор липолиза в жировой ткани, а также предшественник α -меланоцитстимулирующего гормона и пептида (фрагмент 4—10), участвующего в консолидации памяти (превращение кратковременной памяти в долговременную). Гормон роста может регулировать активность иммунной системы, обмен липидов, сахаров и т. д.

Помимо тех тропинов, которые приведены на рис. 23, в аденогипофизе образуются также β - и γ -липотропины (см. таол. 1), регулирующие жировой обмен и многие функции мозга. В средней доле гипофиза содержатся меланоцитстимулирующие гормоны, вызывающие пигментацию кожи и (как ни странно сопоставлять

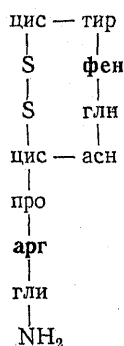
такие факты) закрепление памяти. Образование и секреция этих гормонов также находится под контролем гипоталамуса — существуют либерины и статины меланоцитстимулирующих гормонов.

В задней доле гипофиза (этот отдел называют также нейрогипофизом) депонируются антидиуретический гормон (вазопрессин) и окситоцин.

Окситоцин



Антидиуретический гормон



Первый вызывает задержку воды в крови и повышает тонус сосудов, второй стимулирует сокращение матки при родах и секрецию молока. Оба гормона синтезируются в клетках гипоталамуса, затем транспортируются по аксонам в заднюю долю гипофиза и там секретируются. (Собственно, это гормоны гипоталамуса, однако, восстанавливая «справедливость», можно внести в этот вопрос путаницу, так как во всех современных публикациях их продолжают называть гипофизарными, отмечая параллельно с этим, что они секретируются аксонами гипоталамуса).

Интересно, что одна из форм антидиуретического гормона (лизин-вазопрессин) имеет дополнительную функцию — способствует восстановлению памяти, облегчает процесс «извлечения из памяти», акт воспоминания.

Рассматривая гормоны гипофиза, мы обнаруживаем, что они влияют на развитие инстинктов, поведение, память, т. е. на процессы, протекающие в высших отделах головного мозга. Известно, что и другие, негипофизарные гормоны могут влиять на ЦНС. Так, например, ан-

дрогены и эстрогены определяют половой инстинкт, многие поведенческие реакции. Все это свидетельствует о том, что нейроны, точно так же как и другие клетки нашего организма, находятся под контролем гуморальной системы регуляции. Нервная система — эволюционно более поздняя система регуляции — имеет как управляющие, так и подчиненные связи с эндокринной системой. Поэтому нельзя рассматривать каждую из них в отдельности. В организме существует функционально единая, высокосовершенная нейроэндокринная система регуляции.

2.2.

РЕГУЛЯЦИЯ ОБРАЗОВАНИЯ И РАСПАДА ГОРМОНОВ

В поддержании упорядоченности, согласованности всех физиологических и метаболических процессов, свойственных любому животному организму, участвует около 100 гормонов и нейромедиаторов. Их химическая природа разная — это белки, полипептиды, пептиды, некоторые аминокислоты, производные аминокислот, стероиды, производные жирных кислот, некоторые нуклеотиды, эфиры и т. д. Естественно, что у каждого класса этих веществ пути образования и распада разные. Их метаболизм сравнительно хорошо изучен и описан в учебных руководствах по биохимии и эндокринологии. Мы рассмотрим основные принципы регуляции этого метаболизма.

2.2.1.

БЕЛКОВО-ПЕПТИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Белково-пептидные гормоны, как правило, образуются путем процессинга белковых предшественников. Такие белки-предшественники называют прогормонами. Во многих случаях синтезируются препрогормоны, из которых образуются сначала прогормоны, а затем гормоны.

Возможен и нерибосомальный синтез пептидов за счет функционирования специальных синтетазных ферментных комплексов. Такой механизм образования обнаружен, например, для тиреолиберина.

Синтез белковых предшественников гормонов осуществляется на мембранах шероховатого ретикулума эндокринной клетки. Обычный синтез белков также происходит на этих мембранах и завершается отщеплением образовавшейся полипептидной цепи в цитоплазму. В случае секреторных белков образовавшаяся по-

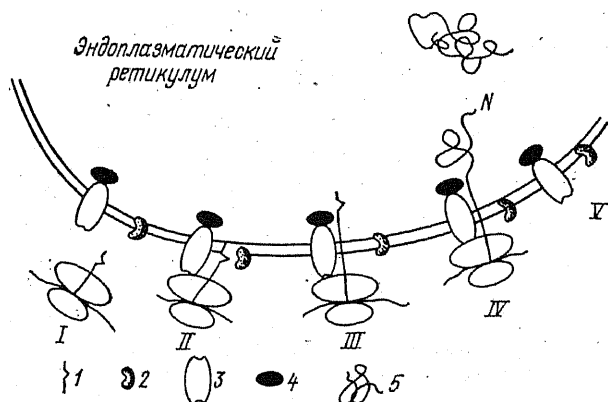


Рис. 26. Последовательность процессов синтеза секретируемого белка, приводящая к его поступлению внутрь полостей эндоплазматического ретикулума: 1 — «сигнальная» последовательность, 2 — белок, связывающий «сигнальную» последовательность; 3 — белок, связывающий рибосому, 4 — пептидаза, 5 — секретируемый белок; I—V — этапы синтеза секретируемого белка

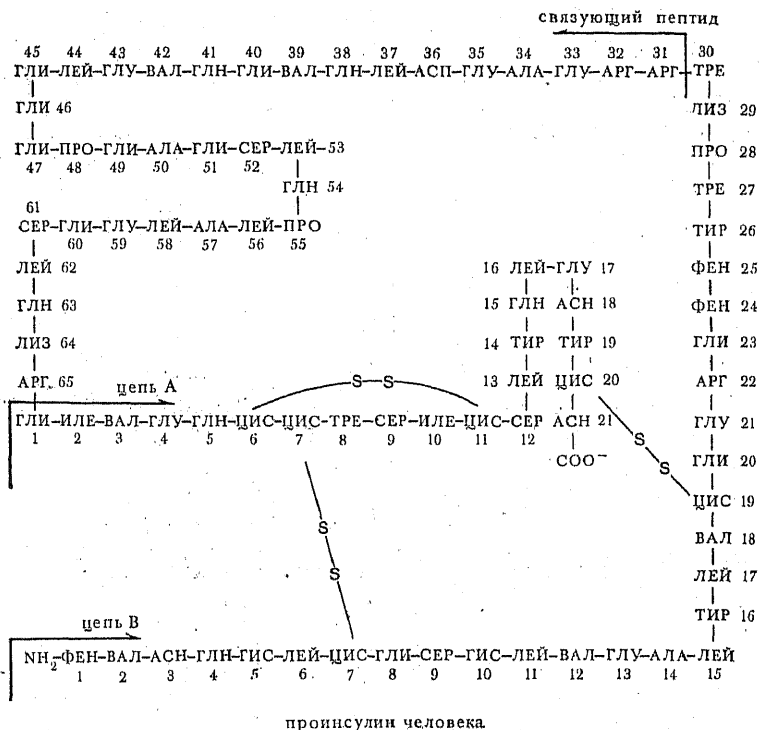
липептидная цепь должна проникнуть через мембрану во внутренние полости ретикулума. Предполагается, что это происходит следующим образом. Матричные РНК секретируемых белковых гормонов имеют на 5'-конце общую нуклеотидную последовательность. Считывание мРНК на рибосомах происходит именно с 5'-конца, поэтому первые 20—25 аминокислотных остатков на N-конце одинаковы у многих секретируемых белков. Как только они образовались, рибосома прикрепляется к мембране ретикулума, поскольку на мембране есть структуры, узнающие и связывающие эту общую для секретируемых белков последовательность (рис. 26).

N-конец секретируемых белков содержит гидрофобные аминокислотные остатки, поэтому он внедряется в мембрану и по мере синтеза пептидной цепи

проникает через мембрану во внутреннее пространство ретикулума. После терминации синтеза препрогормон оказывается внутри ретикулума, после чего от него отщепляется «лишний» N-фрагмент, построенный из 20—25 аминокислотных остатков, и препрогормон становится прогормоном. Превращение прогормона в гормон осуществляется в аппарате Гольджи. Для того чтобы он попал в эти мембраны, эндоплазматический ретикулум формирует специальные гранулы (везикулы), которые затем отшнуровываются от него и попадают в цитоплазму. Везикулы с прогормоном движутся в цитоплазме за счет энергозависимых процессов, в которых участвуют микротрубочки и микрофиламенты. Попадая на мембраны аппарата Гольджи, эти везикулы сливаются с ними, прогормон оказывается внутри полостей, окруженных мембранами аппарата Гольджи. Там специфическая протеаза отщепляет от прогормона «лишние» фрагменты. Образующиеся при этом молекулы гормона окружаются мембраной аппарата Гольджи и в виде специальных везикул транспортируются к плазматической мембране. Внутри этих везикул, как правило, содержатся специальные белки и кофакторы. По мере транспорта этих везикул происходит их «созревание», что выражается в некотором изменении их морфологии и внутреннего состава. Внутри везикул может завершаться модификация молекулы гормона (например, ацетилирование N-конца или амидирование C-конца). После слияния «зрелых» везикул, содержащих молекулы гормона, с плазматической мембраной происходит их разрыв (см. раздел 2.3), выброс гормона, и опустошенные везикулы вновь поступают в цитоплазму эндокринной клетки.

Такая последовательность процессов показана для целого ряда белково-пептидных гормонов. Проиллюстрируем ее на примере синтеза и процессинга молекулы инсулина.

Препроинсулин человека, образующийся в результате рибосомального синтеза на шероховатом ретикулуме β -островков Лангерганса, поджелудочной железы, представляет собой одну полипептидную цепь, состоящую из 109 аминокислотных остатков. После завершения синтеза этот полипептид оказывается внутри ретикулума. Там от его N-конца отщепляется гидрофобный фрагмент, состоящий из 23 аминокислотных остатков.



В молекуле проинсулина все сульфгидрильные группы замкнуты «правильно», т. е. так же, как и в молекуле инсулина. Везикулы с проинсулином переносятся в аппарат Гольджи, в котором мембранная протеиназа выщипывает из молекулы проинсулина (1—86) фрагмент 31—65. В результате этого образуется инсулин — две цепи А и В, соединенные между собой двумя S—S-мостиками. Везикулы, которые формирует аппарат Гольджи, захватывают инсулин, выщипленный пептид (31—65), часть проинсулина (около 5% от количества инсулина), Zn^{2+} (эти ионы с высоким сродством присоединяются к инсулину, изменяют его пространственную структуру и препятствуют растворению). После присоединения инсулиновых гранул к плазматическим мембранам в межклеточное пространство высвобождается весь секрет везикул (см. раздел 2.3).

Синтез молекулы проинсулина происходит за 1—2 мин. Транспорт проинсулина от эндоплазматического

ретикулума до аппарата Гольджи занимает 10—20 мин. «Созревание» везикул, несущих инсулин от аппарата Гольджи до плазматической мембраны, протекает в течение 1—2 ч. При действии на β -клетки глюкозы или глюкагона стимулируется главным образом слияние инсулиновых везикул с плазматическими мембранами, что и приводит к усиленной секреции, а скорости

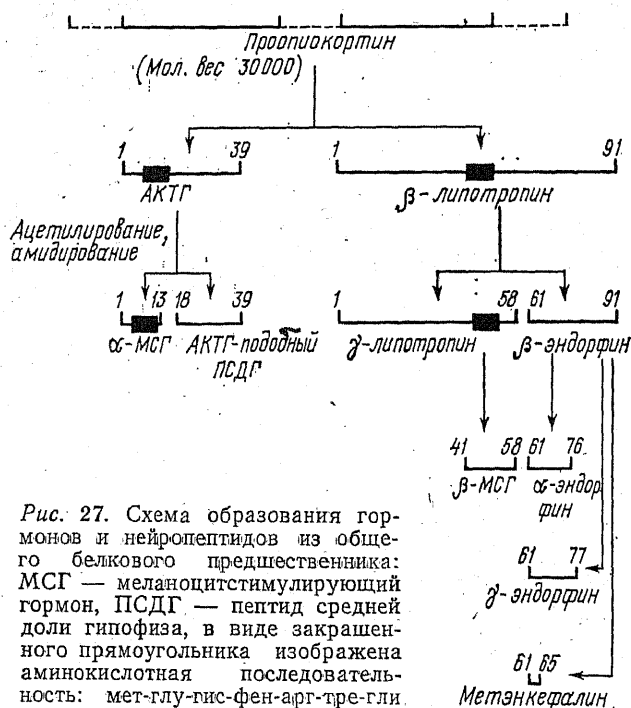


Рис. 27. Схема образования гормонов и нейропептидов из общего белкового предшественника: МСГ — меланоцитстимулирующий гормон, ПСДГ — пептид средней доли гипофиза, в виде закрашенного прямоугольника изображена аминокислотная последовательность: мет-глу-гис-фен-арг-тре-гли.

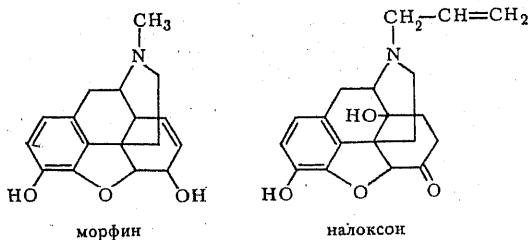
синтеза, процессинга и внутриклеточного транспорта инсулина изменяются в меньшей степени.

От начала синтеза белково-пептидных гормонов до момента появления их в местах секреции проходит 1—3 ч. Низкой скоростью этих процессов, по-видимому, объясняется тот факт, что регуляция уровня белково-пептидных гормонов в крови осуществляется в основном не на стадии синтеза или внутриклеточного транспорта, а на стадии секреции. Большие количества данных гормонов запасены в секреторных гранулах. Регу-

ляторный сигнал, поступающий на эндокринную железу, вызывает опустошение части гранул (см. раздел 2.3). В результате этого концентрация гормона в крови может быстро и значительно повышаться.

Некоторые гормоны гипофиза образуются из общего белкового предшественника. Это играет важную роль в проявлении их биологических эффектов, так как индукция или репрессия синтеза одного из гормонов может приводить к параллельному ускорению или замедлению синтеза ряда других гормонов. Из β -липотропина (рис. 27), имеющего 91 аминокислотный остаток, может образовываться, по крайней мере 6 гормонов: γ -липотропин (1—58), β -меланоцитстимулирующий гормон (41—58), β -эндорфин (61—91), γ -эндорфин (61—77), α -эндорфин (61—76), метионин-энкефалин (61—65).

Энкефалины и эндорфины связываются с так называемыми опиатными рецепторами (агонист — морфин, а антагонист — налоксон) среднего мозга и таламуса (в эти отделы поступают по афферентным волокнам болевые сигналы), а также миндалевидного тела (отдел



мозга, участвующий в создании положительных эмоций, приятных ощущений). Энкефалины — пентапептиды, имеющие N-концевую последовательность (тир-гли-гли-фен, а на С-конце -мет или -лей), и эндорфины, имеющие в своем составе такую же последовательность, называют «гормонами счастья», так как они вызывают обезболивающие эффекты, а также (при высоких концентрациях) чувство эйфории. Преимущественно это нейромедиаторы, которые секретируются пресинаптической мембраной и действуют на рецепторы постсинаптической мембраны. Однако они могут образовываться и в других, помимо нервной, тканях, а также

в крови за счет протеолиза β -липотропина. Энкефалины и эндорфины могут регулировать также функциональную активность гипоталамуса и гипофиза (например, секрецию пролактина). Синапсы, в которых выделяются эти нейромедиаторы, обнаружены в обеих нейроэндокринных железах.

При действии специфических протеиназ из АКТГ (1—39) могут образовываться α -меланоцитстимулирующий гормон (1—13) и АКТГ-подобный пептид средней доли гипофиза (18—39) (см. рис. 27). Меланоцитстимулирующие гормоны усиливают пигментацию кожи. Поскольку один из них имеет последовательность, идентичную N-концевому участку АКТГ (1—13), он может проявлять также очень слабую кортикотропную активность. В свою очередь АКТГ может влиять на пигментацию (причина темной окраски кожи при болезни Аддисона), однако при этом обладает в 40 раз меньшей активностью, чем α -меланоцитстимулирующий гормон.

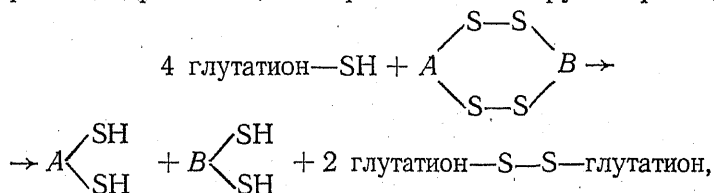
Предшественники белково-пептидных гормонов могут образовываться в печени. Так, октапептид ангиотензин-II образуется в крови из белка с молекулярным весом 58 000, который секретируется печенью (см. раздел 2.2.2). Обнаружено, что энкефалиноподобные пептиды могут образовываться даже из некоторых белков, поступающих в организм с пищей.

Концентрация белково-пептидных гормонов в крови обычно составляет 10^{-10} — 10^{-11} М. При стимуляции эндокринной железы концентрация соответствующего гормона возрастает в 2—5 раз. Например, в состоянии покоя в крови человека содержится около 0,2 мкг АКТГ (в расчете на 5 л крови), а при стрессе это количество возрастает до 0,8—1,0 мкг. В нормальных условиях в крови содержится около 0,5 мкг глюкагона и 5 мкг инсулина. Когда человек голоден, содержание глюкагона повышается до 2 мкг, а инсулина снижается на 40—60%. После сытного обеда концентрация глюкагона в крови в 1,5—2,0 раза снижается, а содержание инсулина повышается до 10—25 мкг.

Полупериод жизни белково-пептидных гормонов в крови составляет 10—20 мин. Они разрушаются протеиназами клеток-мишеней, крови, печени, почек. Возможна и инактивация гормона в самой эндокринной железе, причем этот процесс может быть регулируемым.

Так, например, взаимосвязь между концентрацией Ca^{2+} и паратгормона в крови осуществляется по следующему механизму. Паратгормон, действуя на костную и экскреторные ткани, стимулирует повышение концентрации Ca^{2+} в крови. Ионы Ca^{2+} , в свою очередь, подавляют секрецию паратгормона паращитовидной железой, а также стимулируют в этой железе активность специфической протеиназы, в результате чего инактивация паратгормона ускоряется в 5—10 раз.

Помимо протеиназ инактивировать гормоны могут и другие ферменты, модифицирующие структуру белковой или пептидной молекулы. Так, нативная молекула инсулина не подвергается протеолизу. Первым этапом в инаktivации инсулина является действие трансдегидрогеназы, которая катализирует реакцию

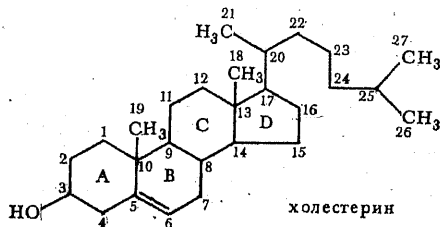


где A и B — соответствующие цепи инсулина. Свободные цепи инсулина становятся доступными для протеолиза и разрушаются инсулиназой (протеиназой, расположенной на мембранах клеток-мишеней), обладающей высокой специфичностью и сродством к инсулину.

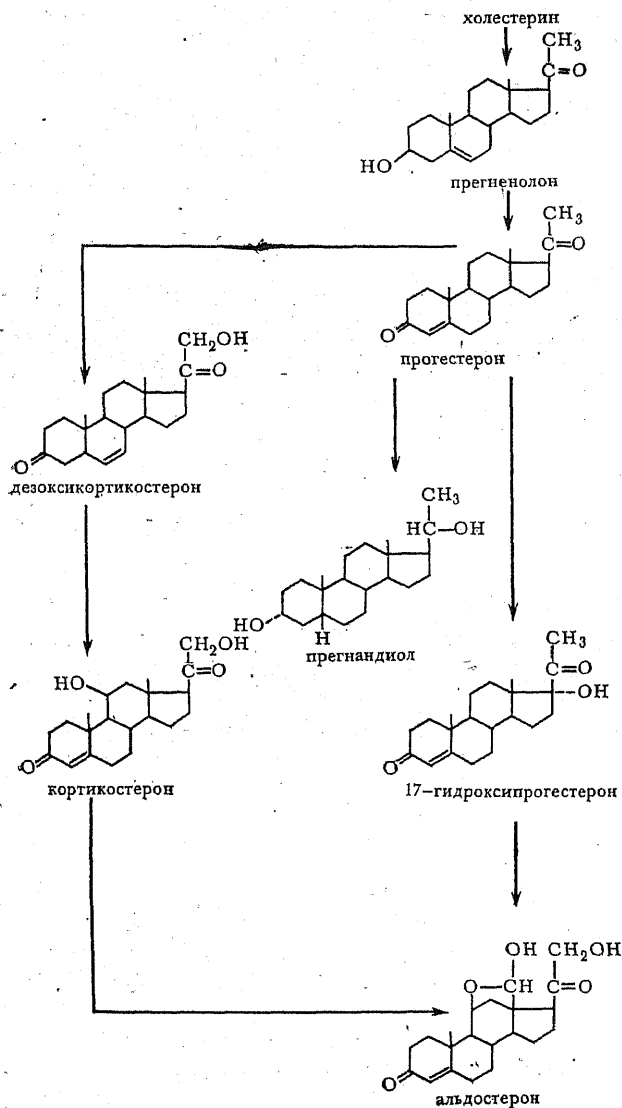
2.2.2.

СТЕРОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Стероидные гормоны — производные циклопентанопергидрофенантрена. Образуются из холестерина в коре надпочечников (кортикостероиды), а также в семен-



никах и яичниках (половые стероиды). Малые количества стероидных гормонов могут образовываться и в ряде других тканей. Так, например, небольшое количество половых стероидов может образовываться в коре



надпочечников, а кортикостероидов — в гонадах. Тип стероидного гормона, образующегося в той или иной ткани, определяется соотношением активностей ферментов, катализирующих альтернативные пути синтеза (рис. 28).

Большая часть холестерина, который используется для синтеза стероидных гормонов, поступает в эндокринные клетки из плазмы, где он связан преимущественно с так называемыми липопротеидами высокой

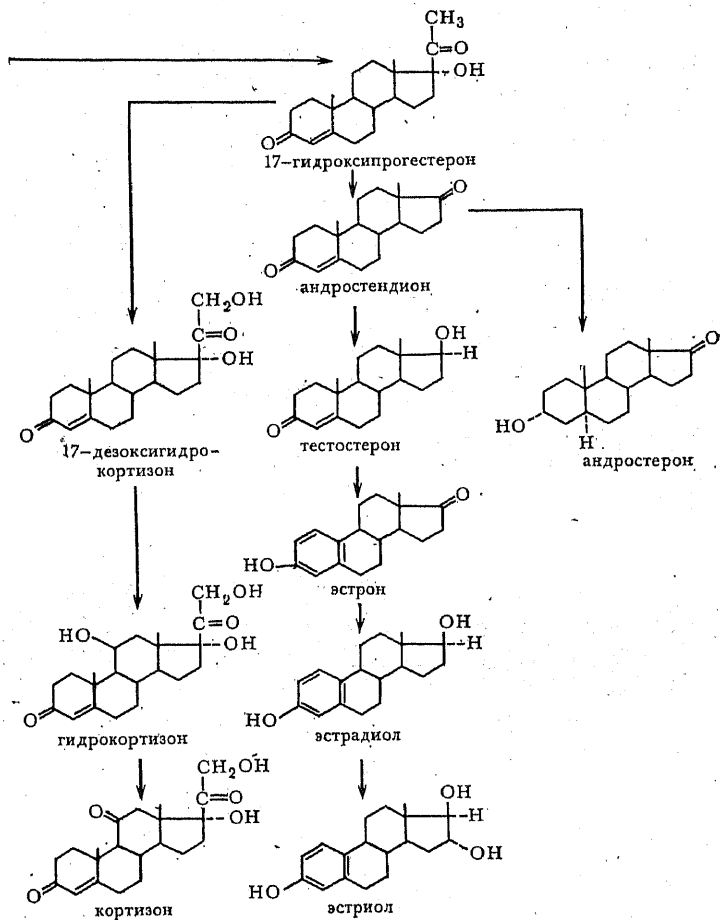


Рис. 28. Основные пути биосинтеза стероидных гормонов

плотности. Около 30—40% холестерина, потребляемого на синтез гормонов, — это эндогенный холестерин. Он образуется в эндокринных клетках и накапливается в липидных каплях. И эндогенный и экзогенный холестерин находится в этерифицированной форме в виде эфиров с ненасыщенными жирными кислотами, поэтому

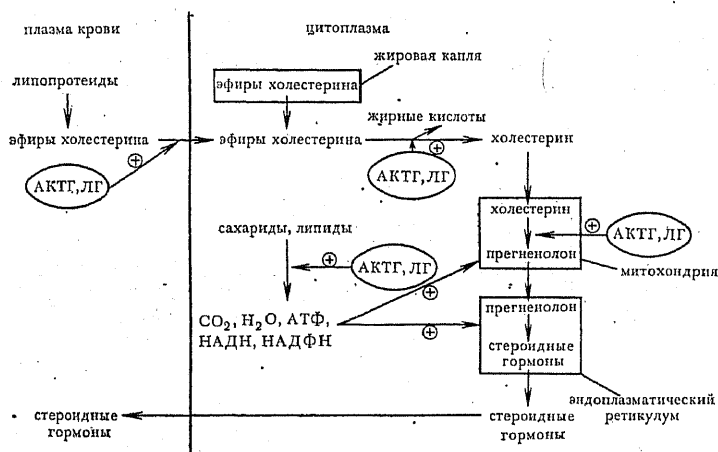


Рис. 29. Регуляция и компартментализация в клетке процессов биосинтеза стероидных гормонов. Регуляторные эффекты АКГГ и ЛГ реализуются через повышение концентрации цАМФ в клетке (см. объяснения в тексте)

первый этап синтеза стероидных гормонов — отщепление жирной кислоты (рис. 29). Эту реакцию катализируют холестеринэстеразы.

Свободный холестерин поступает в митохондрии и там превращается в прегненолон. В этом превращении участвует цитохром P_{450} , десмолаза и другие ферменты. Лимитирующей стадией синтеза прегненолона является гидрокселирование боковой цепи холестерина. Характерно, что прегненолон оказывает ингибирующее влияние на этот процесс.

Образовавшийся прегненолон покидает митохондрию и попадает в эндоплазматический ретикулум. Все дальнейшие реакции образования стероидных гормонов протекают на мембранах ретикулума или в цитоплазме.

В коре надпочечников синтез стероидных гормонов

стимулируется АКТГ, а в половых железах — лютеинизирующим гормоном (ЛГ). Эти гормоны активируют транспорт эфиров холестерина, а также расщепление эфирной связи с жирной кислотой — образование свободного холестерина (см. рис. 29). Оба тропных гормона ускоряют также гидроксилирование ациклической части молекулы холестерина и ее последующее отщепление, т. е. активируют митохондриальные ферменты, участвующие в образовании прегненолона. Кроме того, тропные гормоны активируют процессы окисления сахаров и жирных кислот в эндокринных клетках, что обеспечивает процессы стероидогенеза энергией и пластическим материалом. Так, например, АКТГ стимулирует фосфорилазу, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу, изоцитратдегидрогеназу и малик-фермент. В результате этого в коре надпочечников накапливается НАДФН, необходимый для гидроксилирования стероидов.

Молекулярные механизмы действия АКТГ и ЛГ на синтез стероидных гормонов связаны с образованием цАМФ и последующими реакциями цАМФ-зависимого фосфорилирования. С помощью этого механизма, по-видимому, стимулируется транспорт холестерина, холестеринэстеразы и фосфорилазы. Однако основные эффекты АКТГ и ЛГ на стероидогенез начинают развиваться лишь спустя 10—20 мин после повышения концентрации цАМФ. Кроме того, АКТГ и ЛГ не вызывают синтеза стероидных гормонов в том случае, если эти тропины вводятся одновременно с ингибиторами синтеза белка. Блокирование реакций образования цАМФ препятствует АКТГ- и ЛГ-зависимому стероидогенезу. Существуют, по-видимому, два одинаково важных и согласованно работающих механизма активации стероидогенеза. Один из них опосредуется реакциями цАМФ-зависимого фосфорилирования ферментов, а другой — изменением матричной активности генома. Высказывается предположение, что цАМФ участвует в обоих процессах: стимулирует фосфорилирование белков цитоплазмы, а также вызывает переход протеинкиназы в ядро, фосфорилирование гистоновых и негистоновых белков, связывание регуляторной субъединицы протеинкиназы с хроматином.

В надпочечниках образуется около 30 стероидных гормонов. Большая часть из них, по-видимому, является метаболитами. Так, например, дезоксикортикостерон

оказывает те же эффекты, что и альдостерон, но он в 25—50 раз менее активен.

Кортикостероиды — это C_{21} -стероиды, имеющие в кольце А двойную связь, ОН-группу в 21-м положении и две кетогруппы (3-е и 20-е положение). Они подраз-



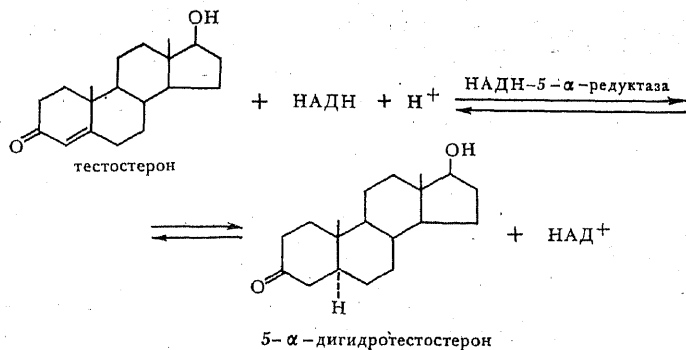
деляются на две группы: глюкокортикоиды и минералокортикоиды. Глюкокортикоиды (типичный представитель — кортизол) индуцируют синтез ферментов глюконеогенеза в печени, препятствуют поглощению глюкозы мышцами и жировыми клетками, а также способствуют высвобождению из мышц молочной кислоты и аминокислот, тем самым ускоряя глюконеогенез в печени. Минералокортикоиды (типичный представитель — альдостерон) задерживают Na^+ в крови. Снижение концентрации Na^+ в секретах слюнных и потовых желез, а также почек приводит к меньшим потерям воды, так как вода движется через биологические мембраны в направлении высокой концентрации солей. В результате этого минералокортикоиды повышают кровяное давление.

Стимуляция синтеза глюкокортикоидов осуществляется через систему гипоталамус—гипофиз—надпочечники (см. рис. 23). Факторы стресса (эмоциональное возбуждение, боль, холод и т. д.), тироксин, адреналин и инсулин стимулируют секрецию кортиколиберина из аксонов гипоталамуса. Этот гормон связывается с мембранными рецепторами аденогипофиза и вызывает секрецию АКТГ. Кортикотропин с током крови попадает в надпочечники и, связываясь там с мембранными рецепторами, стимулирует образование глюкокортикоидов—гормонов, которые вызывают перераспределение энергетических ресурсов между тканями, повышают устойчивость организма к неблагоприятным воздействиям (см. раздел 5.2).

На синтез минералокортикоидов АКТГ влияет слабо. Синтез этих стероидов имеет дополнительный механизм регуляции, осуществляющийся через так называемую ренин-ангиотензиновую систему.

Анализаторы, реагирующие на давление в крови, локализованы в афферентных артериолах почек. При снижении давления крови они вызывают секрецию ренина — специфической эндопротеазы с молекулярным весом 40 000. Эта протеаза отщепляет от α_2 -глобулина крови С-концевой декапептид асп-арг-вал-тир-иле-гис-про-фен-гис-лей, который называют ангиотензин-I. Затем от С-конца пептида карбоксипептидаза отщепляет два аминокислотных остатка. В результате образуется октапептид ангиотензин-II — гормон (хотя он и образуется в крови, а не в эндокринной железе), который имеет специальные рецепторы на мембране клеток коры надпочечников. Связываясь с этими рецепторами, ангиотензин-II увеличивает проницаемость мембран для Ca^{2+} . При этом стимулируется превращение кортикостерона или 11-дезоксикортикостерона в альдостерон. Образовавшийся альдостерон действует на дистальные каналцы почек, потовые и слюнные железы, слизистую кишечника и увеличивает в них реабсорбцию Na^+ , Cl^- и HCO_3^- . В крови повышается концентрация Na^+ и снижается — K^+ и Cl^- . Эти эффекты альдостерона полностью блокируются ингибиторами синтеза белка. Отметим также, что кроме ангиотензина-II и АКТГ синтез и секрецию альдостерина стимулируют также гормон роста и ионы K^+ в плазме крови.

Андрогены, или мужские половые гормоны, — это C_{19} -стероиды, которые продуцируются интерстициаль-



ными клетками семенников и в меньших количествах яичниками и корой надпочечников. Основным андрогеном является тестостерон. Этот гормон может претерпевать изменения в клетке-мишени: превращаться в дигидротестостерон, который обладает большей активностью, чем тестостерон. Интересно, что лютеинизирующий гормон (ЛГ), стимулирующий начальные этапы биосинтеза стероидов в эндокринной железе (см. рис. 29), активирует также превращение тестостерона в дигидротестостерон в клетке-мишени, тем самым усиливая андогенные эффекты.

Эстрогены (женские половые гормоны) в организме человека в основном представлены эстрадиолом. Это C_{18} -стероиды с ароматизированным А-кольцом и ОН-группой в 3-м положении. В клетках-мишенях они, по видимому, не метаболизируют.

Действие андрогенов и эстрогенов направлено преимущественно на органы воспроизведения, появление вторичных половых признаков, поведенческие реакции. Андрогенам свойственны также анаболические эффекты: усиление синтеза белка в мышцах, печени, почках. Эстрогены оказывают катаболическое влияние на скелетные мышцы, но стимулируют синтез белка в сердце и печени. Половые гормоны могут влиять на активность «расплетазы» и тимидинкиназы — ключевых ферментов редупликации ДНК, поэтому им свойственны митогенные эффекты. Основные эффекты половых гормонов опосредуются процессами индукции в репрессии синтеза белка (см. раздел 4.3).

Стероидные гормоны влияют на общую нейроэндокринную регуляцию в организме. Поскольку рецепторы стероидов есть во многих отделах мозга, изменение уровня этих гормонов в крови сказывается на функциях ЦНС и работе гипоталамо-гипофизарной системы (например, глюкокортикоиды тормозят секрецию тироксина, действуя на гипоталамус). Эстрогены индуцируют образование рецепторов прогестина в эпителиальных клетках, рецепторов окситоцина в матке. Глюкокортикоиды усиливают чувствительность жировых клеток и сердца к катехоламинам (пермиссивный эффект).

Как уже отмечалось, мембрана эндокринной клетки не препятствует проникновению стероидных гормонов, поэтому их секреция происходит параллельно с синтезом. Содержание стероидов в крови определяется соот-

ношением скоростей их синтеза и распада. Регуляция этого содержания осуществляется главным образом путем изменения скорости синтеза. Тропные гормоны (АКТГ, ЛГ и ангиотензин) стимулируют этот синтез. Устранение тропного влияния приводит к торможению синтеза стероидных гормонов.

В крови человека около 500 мкг кортизола. При стрессе его содержание повышается до 2000 мкг. Альдостерона в 1000 раз меньше — около 0,5 мкг. Если человек находится на бессолевой диете, содержание альдостерона повышается до 2 мкг. У мужчин содержание тестостерона больше (20—40 мкг), чем у женщин (2—4 мкг). Содержание же эстрадиола у женщин (0,25—2,5 мкг, при беременности — 50—100 мкг) больше, чем у мужчин (0,1—0,2 мкг). Следует отметить, что 90—95% стероидных гормонов в крови обычно находится в связанном состоянии с белками плазмы (см. раздел 2.3). Действующие концентрации стероидных гормонов 10^{-8} — 10^{-10} М. Полупериод их жизни равен 0,5—1,5 ч.

Распад стероидных гормонов может происходить во многих тканях: печени, почках, кишечнике, мышцах и др. Инактивация начинается с восстановления двойной связи в кольце А и гидроксирования. У эстрогенов, имеющих ароматическое А-кольцо, восстановление двойных связей не происходит. Гормон инактивируется путем гидроксирования и метоксилирования. Все эти модификации не только лишают молекулу биологической активности, но и повышают ее гидрофильность. Это имеет важное значение для экскреции метаболитов почками. Дальнейшее присоединение к инактивированным гормонам сульфата, фосфата, глюкуроновой кислоты или глутатиона делает молекулы еще более гидрофильными и тем самым ускоряет их удаление из организма.

2.2.3.

ТИРЕОИДНЫЕ ГОРМОНЫ

Синтез тиреоидных гормонов протекает в щитовидной железе, для которой характерно высокое содержание ионов йода. Йодид химически инертен. Окисление его в щитовидной железе происходит при участии пероксидазы. Образующийся йодиний (ион I^+) присоединяется к фенольному кольцу тирозила или к имида-

зольному кольцу гистидила, входящих в состав белков. В щитовидной железе йодируется главным образом тиреоглобулин — тетрамерный белок, имеющий молекулярный вес 660 000 и содержащий около 120 тирозилов. Йодирование тирозиновых остатков происходит при участии H_2O_2 и завершается образованием

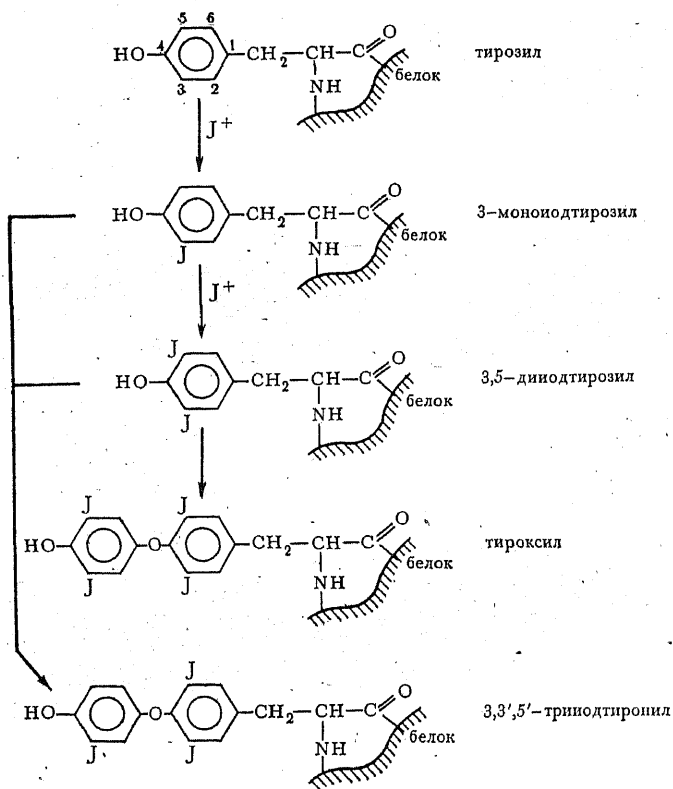
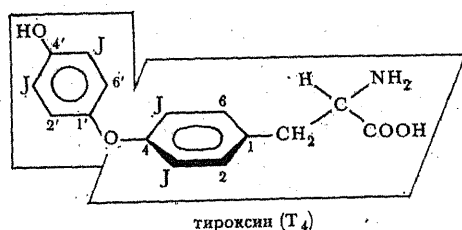


Рис. 30. Биосинтез тиреоидных гормонов

моиодтирозилов и дийодтирозилов. После этого происходит внутримолекулярная перегруппировка — «сшивки» двух йодированных тирозилов (рис. 30). Эта окислительная реакция также протекает с участием пероксидазы и завершается образованием в составе тиреоглобулина трийодтиронила и тироксила. Для того чтобы эти гормоны освободились из связи с белком,

должен произойти протеолиз тиреоглобулина. При расщеплении одной молекулы этого белка, построенной более чем из 5000 аминокислот и 300 углеводов, образуется всего лишь 2—5 молекул тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3). T_4 и T_3 секретируются в молярных соотношениях, равных 4 : 1.



Синтез и секреция тиреоидных гормонов находятся под контролем гипоталамо-гипофизарной системы (см. раздел 2.1). Тиреолиберин, секретируемый гипоталамусом, связывается с рецепторами аденогипофиза и вызывает активацию аденилатциклазы. В результате повышения концентрации цАМФ происходит секреция тиреотропного гормона — белка с молекулярным весом 28 000 (см. табл. 1), построенного из двух субъединиц и содержащего 22 остатка цистеина. Как и у других секретируемых белков, у тиреотропного гормона все SH-группы окислены — они образуют 11 S—S-мостиков, стабилизирующих молекулу белка. Предполагается, что в щитовидной железе тиреотропный гормон связывается не только с рецептором белковой природы, но и с ганглиозидом G_{M1} , локализованным на наружной поверхности плазматической мембраны. Тиреотропный гормон активирует аденилатциклазу щитовидной железы и именно этим, по-видимому, объясняется его стимулирующее действие на синтез и секрецию T_3 и T_4 . Адреналин и простагландин E_2 также могут повышать концентрацию цАМФ в щитовидной железе. При этом они вызывают такие же эффекты, как и тиреотропин. Показано также, что тиреотропин стимулирует вход Ca^{2+} в щитовидную железу. Активный транспорт ионов йода в железу протекает против 500-кратного градиента. Это процесс, который подавляется убаином (сердечным гликозидом), специфически ингибирующим Na^+ -насос. Активный

транспорт ионов йода ускоряется путем цАМФ-зависимого фосфорилирования клеточных мембран щитовидной железы. Под действием тиреотропина стимулируется также синтез мРНК тиреоглобулина и рибосомальной РНК, т. е. происходит усиление как транскрипции, так и трансляции белка, служащего источником тирозинов для синтеза T_3 и T_4 . Тиреотропин стимулирует

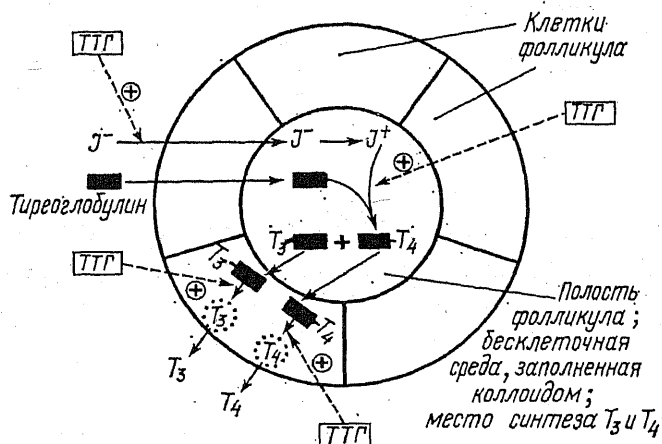


Рис. 31. Компартиментализация и регуляция процессов синтеза и секреции тироксина (T_4) и трийодтиронина (T_3) в щитовидной железе. Пунктирными линиями показано регуляторное влияние тиреотропного гормона (ТТГ), которое осуществляется путем повышения концентрации цАМФ в клетке

также рост эпителиальных клеток щитовидной железы. Эти клетки формируют фолликул (рис. 31), в полости которого (бесклеточная среда, заполненная коллоидом, основной составной частью которого является тиреоглобулин) происходит йодирование тирозилов.

Секреция T_3 и T_4 идет путем пиноцитоза. При этом на апикальной стороне эпителиальных клеток происходит захват частичек коллоида (вместе с йодированным тиреоглобулином). Частички окружаются мембраной эпителиальной клетки и поступают в цитоплазму в виде пиноцитозных пузырьков. При слиянии пузырьков с лизосомами эпителиальной клетки тиреоглобулин расщепляется, T_3 и T_4 через базальную мембрану секретируются в кровь и лимфу. Вместе с T_3 и T_4 могут секретиро-

ваться моно- и диiodтирозин. Они быстро дейодируются и вновь поступают в фолликул.

Тиреотропный гормон и другие факторы, повышающие концентрацию цАМФ в щитовидной железе, стимулируют пиноцитоз коллоида — процесс образования и движения пиноцитозных пузырьков. Таким образом, тиреотропин ускоряет не только биосинтез, но и секрецию T_3 и T_4 .

При повышении в крови концентрации T_3 и T_4 подавляется секреция тиреолиберина и тиреотропного гормона (см. раздел 2.1). Кроме того, тиреоидные гормоны повышают в плазме крови концентрацию протеиназ, расщепляющих тиреолиберин (возможно, это происходит за счет того, что T_3 и T_4 индуцируют образование и секрецию почками или печенью пироглутаматпептидазы, которая отщепляет от тиреолиберина N-концевой остаток — пироглутамат).

Ретроингибирование, наблюдающееся в процессах биосинтеза тиреоидных гормонов, может сказываться и на других гормональных системах организма, так как тиреолиберин стимулирует секрецию не только тиреотропного гормона, но и гормона роста (см. раздел 2.1), а кроме того, он имеет так называемые «поведенческие» эффекты.

Обратная связь в биосинтезе тиреоидных гормонов может замыкаться также за счет того, что T_4 тормозит синтез тиреоглобулина.

Тиреоидные гормоны являются «долгожителями» среди всех гормонов и нейромедиаторов. Они могут циркулировать в крови в неизменном виде в течение нескольких дней. Такая устойчивость гормонов объясняется, по-видимому, образованием прочной связи с T_4 -связывающими глобулинами и преальбуминами в плазме крови (см. раздел 2.3). Эти белки имеют в 10—100 раз большее сродство к T_4 , чем к T_3 , поэтому в крови человека содержится 300—500 мкг T_4 и лишь 6—12 мкг T_3 .

Наиболее уязвимы в молекуле T_3 и T_4 атомы йода в положениях 3' и 5'. Их отщепление приводит к потере биологической активности гормона. После дейодирования тиронин может восстанавливаться до двух молекул тирозина. Тиронин (а возможно, даже йодтиронины) может подвергаться также декарбоксилированию, дезаминированию или переаминированию. В печени и

почках могут образовываться конъюгаты тиронина с глюкуроновой кислотой или сульфатом, которые затем экскретируются.

2.2.4.

КАТЕХОЛАМИНЫ

Источником катехоламинов, как и тиреоидных гормонов, служит тирозин, однако в случае биосинтеза катехоламинов метаболizmu подвергается свободная аминокислота, а не тирозин белка. Как видно на рис.

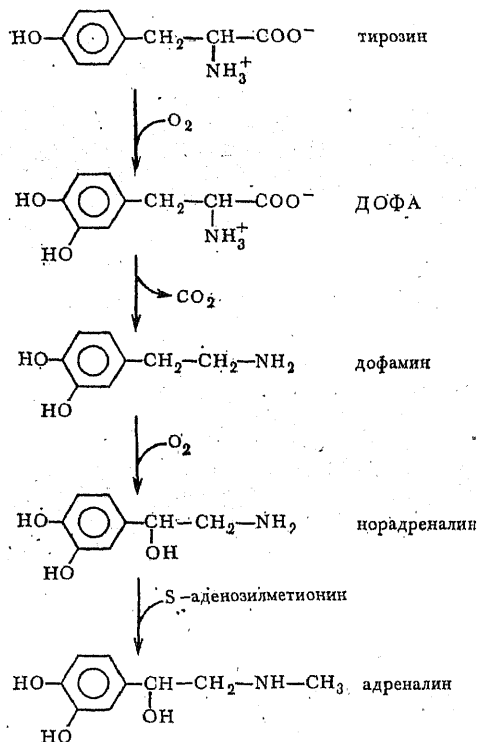


Рис. 32. Биосинтез катехоламинов

32, образование катехоламинов протекает через стадии окисления (при участии Cu -содержащих ферментов), декарбоксилирование и метилирования молекулы. Син-

тезируются катехоламины в аксонах нервных клеток, а накапливаются в синаптических пузырьках. Катехоламины, образующиеся в мозговом слое надпочечников, секретируются в кровь, а не в синаптическую щель, т. е. являются типичными гормонами.

Синтез катехоламинов в некоторых клетках заканчивается образованием и накоплением в терминалях дофамина, а адреналин и норадреналин образуются этими клетками в небольших количествах. Такие клетки есть в составе гипоталамуса. Предполагается, что пролактостатином, т. е. гормоном гипоталамуса, подавляющим секрецию пролактина (см. раздел 2.1), является дофамин. Известны и другие структуры мозга (например, стрнарная система), которые находятся под влиянием дофамина и не чувствительны, например, к адреналину.

В симпатических нервных волокнах дофамин не накапливается, а быстро превращается в норадреналин, который хранится в синаптических пузырьках. Адреналина в этих волокнах значительно меньше, чем норадреналина.

В мозговом слое надпочечников биосинтез завершается образованием адреналина. Норадреналина образуется в 4—6 раз меньше, а дофамин сохраняется лишь в следовых количествах.

Превращение тирозина в диоксифенилаланин (ДОФА), а затем в дофамин (см. рис. 32) протекает в цитоплазме. Дофамин проникает в специальные гранулы (везикулы). Если в этих гранулах есть соответствующий фермент (дофамин- β -оксидаза) и кофакторы, то дофамин внутри гранул превращается в норадреналин (рис. 33). Норадреналин может секретироваться из этой гранулы во внеклеточное пространство или же выходить из нее в цитоплазму нервной клетки и там под действием метилазы превращаться в адреналин. Адреналин из цитоплазмы поступает в специальные адреналиновые гранулы и затем секретирывается из них.

В гранулах, запасующих катехоламины, всегда присутствует специальный катехоламинсвязывающий белок и АТФ. Секреция сопровождается выбросом в кровь или в синаптическую щель как катехоламина, так и АТФ и связывающего белка.

Синтез катехоламинов в мозговом слое надпочечников стимулируется нервными импульсами, поступаю-

щими по чревному нерву. Выделяющийся в синапсах ацетилхолин взаимодействует с холинергическими рецепторами никотинового типа и возбуждает нейросекреторную клетку надпочечника. Наиболее медленной стадией в биосинтезе катехоламинов является первый этап — превращение тирозина в ДОФА (см. рис. 32).

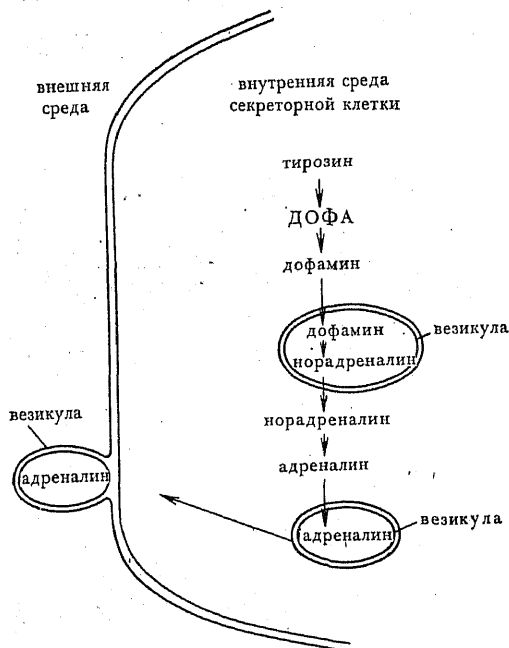


Рис. 33. Места синтеза и секреции катехоламинов

Эту реакцию катализирует тирозингидроксилаза — фермент, который активируется при холинергической стимуляции клетки. Благодаря наличию нервно-рефлекторных связей, надпочечники отвечают усилением синтеза и секреции катехоламинов на болевые и эмоциональные раздражители, гипоксию, гипотонию, мышечную нагрузку, охлаждение и т. д. Существуют и гуморальные пути регуляции активности клеток мозгового вещества надпочечников. Синтез и секреция катехоламинов могут возрастать под действием инсулина и глюкокортикоидов, а также при гипогликемии.

Катехоламины подавляют как собственный синтез, так и секрецию. Адреналин — мощный ингибитор митиллазы, катализирующей превращение норадреналина в адреналин.

Активируя аденилатциклазу нейросекреторной клетки, катехоламины могут вызывать цАМФ-зависимое фосфорилирование тирозингидроксилазы, в результате чего активность «пускового» фермента биосинтеза резко снижается. В адренергических синапсах на пресинаптической мембране есть α -адренергические рецепторы. При выбросе катехоламинов в синапс эти рецепторы активируются и начинают оказывать ингибирующее влияние на секрецию катехоламинов. Аутоингибирование секреции свойственно, по-видимому, всем катехоламинам и обнаружено во всех тканях, секретирующих эти гормоны или нейромедиаторы.

В отличие от холинергических синапсов, постсинаптическая мембрана которых содержит как рецепторы, так и ацетилхолинэстеразу, разрушающую ацетилхолин, в адренергических синапсах нет ферментов, разрушающих медиатор. Удаление из синапса катехоламинов происходит путем обратного захвата медиатора нервным окончанием. Это активный транспорт, происходящий с большой скоростью и имеющий высокую избирательность. Поступающие в нервное окончание из синапса катехоламины вновь концентрируются в специальных везикулах и могут повторно участвовать в синаптической передаче. Ингибиторы обратного захвата катехоламинов могут вызывать эффекты, подобные симпатической денервации. Такой эффект вызывает, в частности, резерпин, который блокирует обратный захват норадреналина и его перемещение в везикулы.

Определенные количества катехоламинов могут диффундировать из синапсов в межклеточное пространство, а затем в кровь. Именно этим, по-видимому, объясняется тот факт, что содержание норадреналина в крови больше, чем содержание адреналина, несмотря на то, что мозговое вещество надпочечников секретирует в кровь главным образом адреналин, а норадреналин секретируется преимущественно в синапсах. Суммарное содержание катехоламинов в крови человека равно 1,5—2,5 мкг. При стрессе оно повышается в 4—8 раз. Полупериод жизни катехоламинов в крови равен 1—3 мин.

Отметим, что гематоэнцефалический барьер не пропускает катехоламины из крови в мозг. В то же время, диоксифенилаланин — предшественник катехоламинов (см. рис. 32) — легко проникает через этот барьер и может усилить образование катехоламинов в мозге. Вводя в кровь диоксифенилаланин, борются, в частности, с болезнью Паркинсона, которая вызывается низкой концентрацией дофамина в стриарной системе мозга и выражается в дрожании конечностей и полной апатии.

Катехоламины могут инактивироваться в тканях-мишенях, в печени и почках. Решающее значение в этом процессе имеют два фермента — моноаминоксидаза, расположенная в митохондриях, и катехол-О-метилтрансфераза — цитозольный фермент. Моноаминоксидаза вызывает окислительное дезаминирование не только катехоламинов, но, по-видимому, и тирамина, серотонина и др. Катехол-О-метилтрансфераза катализирует оксиметилирование катехольного кольца. После этого катехоламины утрачивают биологическую активность и экскретируются. Незначительные количества катехоламинов экскретируются в виде сульфопроизводных и глюкуронидов.

2.2.5.

ПРОСТАГЛАНДИНЫ

Простагландины иногда называют гормоноподобными веществами, так как они оказывают местное действие — влияют на соседние клетки и не переносятся током крови к другим органам. Впервые структура и функция этих веществ (в настоящее время известно более 20 природных простагландинов) была установлена лишь 20 лет назад. Они образуются из ненасыщенных жирных кислот. Количество ненасыщенных связей в молекуле простагландина обозначают цифрой, стоящей справа внизу от названия (например, ПГ₁, ПГ₂, ПГ₃). Их подразделяют также на группы: А-ненасыщенные кетоны, Е-оксикетоны, F-1,3-диоли.

Рассмотрим биосинтез простагландинов, имеющих две ненасыщенные связи. Начинается он с отщепления арахидоновой кислоты от мембранного фосфолипида. Эту реакцию катализирует фосфолипаза А₂.

Циклооксигеназа при участии O₂ преобразует 20-углеродную полиеновую кислоту в эндоперекись. Затем

из эндоперекиси образуется целое семейство простагландинов. Наиболее хорошо изучены простагландины групп *E* и *F* (рис. 34).

Эндоперекиси, образующиеся в процессе биосинтеза простагландинов, обладают высокой биологической активностью в опытах *in vitro*, но едва ли влияют на клетки *in vivo*, так как очень неустойчивы — полупери-

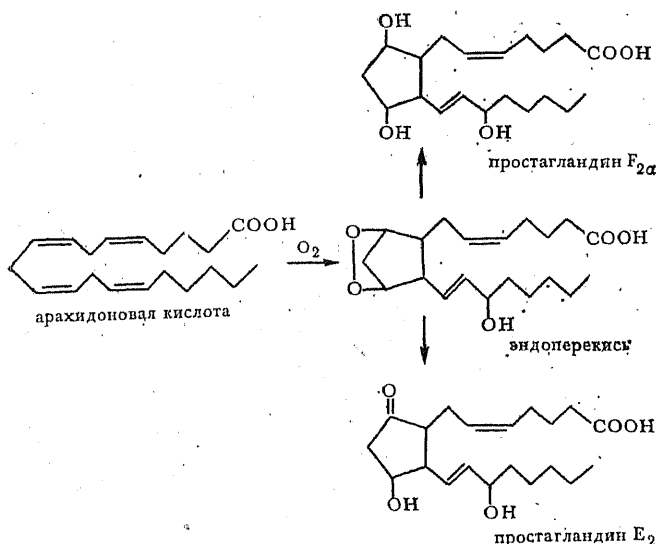


Рис. 34. Основные пути образования простагландинов из арахидоновой кислоты

од их жизни менее одной секунды. Простагландин-синтетазный комплекс представляет собой полиферментную систему, функционирующую преимущественно на мембранах эндоплазматического ретикулума. Образующиеся простагландины проникают в плазматическую мембрану клетки. Они могут выходить из клетки и через межклеточное пространство переноситься на соседние клетки или проникать в кровь и лимфу.

Лимитирующим этапом в биосинтезе простагландинов является освобождение арахидоновой кислоты. Этот процесс катализирует фосфолипаза A_2 — фермент, который нуждается в ионах Ca^{2+} и, видимо, активируется путем цАМФ-зависимого фосфорилирования (рис. 35).

Благодаря этому все гормоны и нейромедиаторы, активирующие аденилатциклазу или повышающие концентрацию Ca^{2+} в клетке, могут стимулировать синтез простагландинов. Этот синтез идет практически в любой клетке, поэтому число стимуляторов синтеза простагландинов исчисляется десятками.

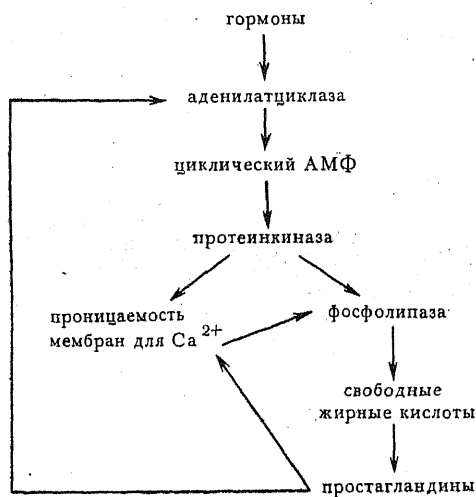


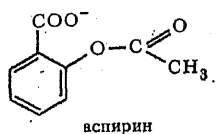
Рис. 35. Взаимосвязь между содержанием в клетке цАМФ, ионов Ca^{2+} и простагландинов

В семенниках и яичниках, где синтез простагландинов наиболее интенсивен, используется арахидоновая кислота, отщепляемая не только от фосфолипидов, но и от этерифицированного холестерина. В этих тканях лютеинизирующий гормон путем повышения концентрации цАМФ стимулирует холестерин-эстеразу и холестерин-ацетилтрансферазу, в результате чего образуется свободный холестерин, вступающий в стероидогенез (см. раздел 2.2.2), и арахидоновая кислота — источник простагландинов.

Простагландины группы *E* могут активировать аденилатциклазу, а *F* — увеличивать проницаемость мембран для Ca^{2+} . Поскольку цАМФ и Ca^{2+} стимулируют синтез простагландинов, замыкается положительная об-

ратная связь в синтезе этих специфических регуляторов (см. рис. 35).

Между физиологическими эффектами разных простагландинов наблюдается антагонизм. Так, например, простагландины группы *E* часто вызывают расслабление, а *F* — сокращение гладких мышц (возможно, поэтому ПГЕ способствуют оплодотворению, а ПГФ — вызывают аборт), простагландины группы *F* индуцируют аллергические реакции, а *E* — подавляют их. Во многих тканях кортизол тормозит освобождение арахидоновой кислоты, тем самым подавляя образование простагландинов. Именно этим принято объяснять противовоспалительное действие глюкокортикоидов. Простагландин *E*₁ является мощным пирогеном. Подавлением его синтеза объясняют терапевтическое действие аспирина, который ингибирует циклооксигеназу, вызывая, по-видимому, ее ацетилирование.



Полупериод жизни простагландинов 1—20 с. У человека и большинства млекопитающих основной путь инактивации простагландинов — окисление 15-гидрок-

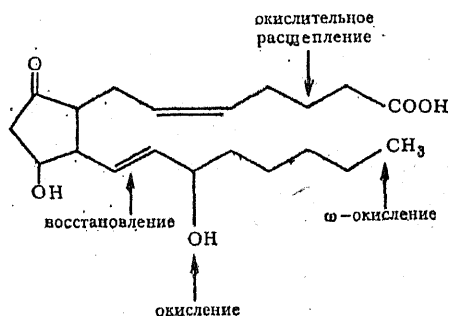


Рис. 36. Основные пути инактивации простагландинов в тканях

сигруппы до соответствующего кетона (рис. 36). Эту реакцию катализирует 15-гидрокси-ПГ-дегидрогеназа — фермент, который есть практически во всех тканях (в

легких — в наибольших количествах). Окисление ОН-группы в 15-м положении приводит к инактивации молекулы. Поэтому кровь, прошедшая через легкие, полностью лишена биологически активных простагландинов. Интересно, что цАМФ активирует, а ионы Ca^{2+} ингибируют ПГ-дегидрогеназу. Этот фермент ингибируется также дифтерийным токсином и эндотоксином *E. coli*. Предполагается, что такое ингибирование опосредуется АДФ-рибозилированием фермента.

Дальнейшая деградация простагландинов происходит путем восстановления двойной связи (в положении 13—14), β -окисления COOH -конца и ω -окисления CH_3 -конца молекулы. После этого образуется 16-углеродная дикарбиновая кислота, которая выводится из организма.

2.3

СЕКРЕЦИЯ И «ТРАНСПОРТ» ГОРМОНОВ

Благодаря своей липофильности, стероидные гормоны не накапливаются в эндокринных клетках, а легко проходят через мембрану и поступают в кровь и лимфу. В силу этого регуляция содержания стероидных гормонов в крови осуществляется путем изменения скорости их биосинтеза (см. раздел 2.2.2).

Тиреоидные гормоны также липофильны и легко проходят через мембрану, однако они ковалентно связаны в эндокринной железе с тиреоглобулином, поэтому могут секретироваться только после нарушения этой связи (см. раздел 2.2.3). Чем больше йодированных тиронилов в составе тиреоглобулина и чем выше скорость протеолиза йодированного белка, тем больше будет тиреоидных гормонов в крови. Регуляция содержания тиреоидных гормонов осуществляется путем ускорения процессов йодирования и разрушения тиреоглобулина.

Белково-пептидные гормоны, а также катехоламины, гистамин, серотонин и т. п. — это гидрофильные вещества, которые не могут диффундировать через мембрану. Для секреции этих молекул созданы специальные механизмы, чаще всего пространственно и функционально разобщенные с процессами биосинтеза.

Многие белково-пептидные гормоны образуются из предшественников большого молекулярного веса, и секреция этих гормонов становится возможной только после того, как произойдет отщепление «лишнего» фрагмента. Так, секреция инсулина предшествует превращению в β -клетках препроинсулина в проинсулин, а затем в инсулин (см. раздел 2.2.1). Существование прогормонов защищает эндокринную железу от местного действия гормона, обеспечивает его внутриклеточный транспорт. По мере превращения препрогормона в гормон, как правило, возрастает гидрофильность молекулы. Последовательная модификация белка приводит к тому, что из эндоплазматического ретикулула он переходит в цистерны аппарата Гольджи, а затем в специальные образования (везикулы) плазматической мембраны. В везикулах завершается синтез молекулы гормона, мембрана везикулы защищает гормон от инактивации, но главный выигрыш, который дает такой способ запасаения гормона, — это быстрый выброс в кровь больших количеств регулятора. Биосинтез некоторых белково-пептидных гормонов, их транспорт к периферии секреторной клетки занимает 1—3 ч. Очевидно, что воздействие на биосинтез приведет к изменению уровня этих гормонов в крови лишь через несколько часов. Влияние же на секрецию гормонов, синтезированных «впрок» и запасенных в специальных гранулах, позволяет повышать концентрацию гормонов в крови в несколько раз за секунды или минуты.

Нейромедиаторы (норадреналин, дофамин, глутаминовая кислота, γ -аминомасляная кислота, глицин, олигопептиды), вызывающие появление потенциала действия на клетке, синтезируются в нервных окончаниях и накапливаются в везикулах, окруженных мембраной (рис. 37). Везикула может передвигаться в нервном окончании. Попадая в так называемый «участок выброса медиатора», везикула разрывается; и ее содержимое изливается в синаптическую щель. Нейромедиатор диффундирует через эту щель, связывается с рецептором на постсинаптической мембране, а активированный рецептор вызывает пассивный вход Ca^{2+} и Na^{+} в клетку. В одном синаптическом пузырьке содержится всего несколько тысяч молекул медиатора. Такое количество нейромедиатора может активировать лишь малую долю синаптических рецепторов. Поэтому разрыв одной

везикулы приводит к изменению мембранного потенциала лишь на 0,5 мВ. Это изменение заряда называют миниатюрным потенциалом. Он не распространяется далее синапса и не приводит к каким-либо физиологическим эффектам, хотя играет важную роль в поддержании синаптических структур в состоянии готовности к восприятию и проведению возбуждающего сигнала. Частота возникновения миниатюрных потенциалов (в

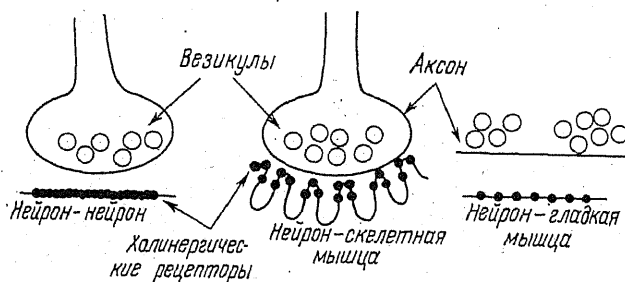


Рис. 37. Три типа холинергических синапсов: между двумя нейронами, нейроном и волокном скелетной мышцы, нейроном и клеткой гладкой мышцы

среднем 1 раз в секунду) полностью определяется частотой разрыва синаптических везикул.

Нейромедиаторы выделяются «квантами» по несколько тысяч молекул. Нервный импульс не изменяет величины «квантов» медиатора, но повышает частоту их выделения. Когда возбуждающий потенциал приходит в нервное окончание, за одну миллисекунду в синапс изливается содержимое 200—400 везикул. Следовательно, при возбуждении частота миниатюрных потенциалов возрастает в 200—400 тыс. раз. В тысячи раз большее число молекул нейромедиатора достигает постсинаптической мембраны. Все (или почти все) рецепторы переходят в активированное состояние. Открывается большое число «каналов» входа Na^+ и Ca^{2+} , в результате чего на постсинаптической мембране возникает (а затем распространяется по всей плазматической мембране клетки) потенциал действия. Так химическим путем осуществляется передача электрического заряда с нервной клетки на иннервируемую. Решающее значение в том, как и в других секреторных про-

цессах, имеет Ca^{2+} . Появление потенциала действия на нервном окончании приводит к входу Ca^{2+} в аксоплазму, в результате чего и стимулируется секреция нейромедиатора. Зависимость выброса медиатора от концентрации Ca^{2+} — кооперативный процесс с коэффициентом Хилла, равным 3—4.

Вместе с гормоном или нейромедиатором из везикулы выбрасываются и другие вещества, которые могут влиять на проведение регуляторного сигнала. В случае секреции катехоламинов это специальные связывающие белки, АТФ и РНК, в случае инсулина — ионы Zn^{2+} . Опустошённые везикулы не разрушаются. Они реконструируются и вновь возвращаются к месту синтеза гормона.

Выход катехоламинов из мозгового слоя надпочечников происходит под влиянием ацетилхолина. Связываясь со своими рецепторами, этот нейромедиатор в сотни раз усиливает вход в клетку ионов Na^+ и Ca^{2+} , в результате чего происходит деполяризация мембраны. В отсутствие Ca^{2+} ацетилхолин может вызывать деполяризацию, однако при этом не происходит секреция катехоламинов.

Кальций необходим также для секреции гормонов гипофиза. Известно, что в отсутствие Ca^{2+} не происходит выброс нейромедиаторов (ацетилхолина и норадреналина) из нервных окончаний. Устранение Na^+ и K^+ из перфузируемых растворов мало влияет на секреторную активность эндокринных и экзокринных желез, а устранение Ca^{2+} полностью блокирует их функции. Следовательно, для секреции гормонов и нейромедиаторов важна не собственно деполяризация мембраны, а происходящий при ней вход Ca^{2+} .

В зависимости от характера регуляторного сигнала, поступающего на железу, Ca^{2+} может входить в цитоплазму из разных «депо». Слюнные железы могут секретировать пищеварительные ферменты (например, амилазу), а также жидкость и электролиты (слюна). При активации β -адренергических рецепторов катехоламинами в клетках железы повышается концентрация цАМФ, происходит фосфорилирование внутриклеточных мембран и Ca^{2+} выходит из внутриклеточных «депо» в цитоплазму. При β -адренергической стимуляции не изменяется проницаемость плазматической мембраны для ионов Ca^{2+} и одновалентных катионов. Ионы Ca^{2+} , пос-

тупившие в цитоплазму из внутриклеточных «депо», вызывают секрецию пищеварительных ферментов. При действии ацетилхолина на холинергические рецепторы или катехоламинов на α -адренергические рецепторы возрастает проницаемость для Ca^{2+} плазматических мембран слюнной железы. В результате этого происходит секреция жидкости и электролитов (однако не происходит секреция пищеварительных ферментов).

Возможно, «рецептор» Ca^{2+} , вызывающий экзоцитоз гормонов и нейромедиаторов, расположен внутри цитоплазматической мембраны. Роль такого «рецептора» могли бы выполнять тропониноподобные белки мембраны. Существует также предположение, что «рецептором» Ca^{2+} в мембране является кальмодулин или легкие цепи миозина (см. раздел 4.2). — белки, которые также могут связывать Ca^{2+} . В любом случае зависимость секреции гормонов и нейромедиаторов от Ca^{2+} связана, по-видимому, с функционированием мембранных сократительных белков.

В мембранах нервных и эндокринных клеток функционируют актомиозиноподобные белки, способные «сокращаться» под действием Ca^{2+} , т. е. функционирующие, как сократительные белки мышц. В мембране пузырька, наполненного гормоном или нейромедиатором, преимущественно содержится «миозин», по многим свойствам идентичный миозину мышц (молекулярный вес, АТФазная активность). В базальной мембране, к которой прикреплен секреторный пузырек, содержится «актин», белок, способный полимеризоваться — деполимеризоваться и взаимодействовать с миозином. Связывание Ca^{2+} с тропониноподобными белками мембраны снимает ингибирующее влияние последних на сократительные белки. Начинает образовываться «актомиозиновый комплекс» — миозин скользит между нитями актина, сжимая секреторный пузырек и повышая в нем гидростатическое давление. Это сжатие завершается разрывом пузырька и выбросом секрета в наружную среду. Такой механизм секреции постулируется для ацетилхолина, катехоламинов, либеринов и статинов, ряда тропинов и других специфических регуляторов.

Секреция инсулина контролируется двумя механизмами. Повышение концентрации сахара в крови вызывает связывание глюкозы с рецепторами β -клеток ост-

ровков Лангерганса. В результате этого возникает возбуждающий потенциал, приводящий к секреции инсулина.

Глюкагон, образующийся в α -клетках островков Лангерганса, также стимулирует секрецию инсулина, однако осуществляет это цАМФ-зависимым путем без образования потенциала действия. Считается, что активация глюкагоном аденилатциклазы и последующее возрастание концентрации цАМФ приводит к фосфорилированию мембран, в результате чего повышается их проницаемость для Ca^{2+} и происходит секреция инсулина. Циклический АМФ облегчает также секрецию инсулина, происходящую под действием глюкозы.

В других клетках цАМФ, а следовательно, и гормоны, активирующие синтез этого нуклеотида, могут препятствовать секреции. В тучных клетках, имеющих едва ли не во всех тканях, происходит синтез гистамина (путем декарбоксилирования гистидина) и его запасаение. Антиген, стимулирующий секрецию, связывается с рецептором *IgE* на мембране тучной клетки, и это вызывает повышение проницаемости мембраны для Ca^{2+} . Через Ca -связывающие белки Ca^{2+} запускает систему экзоцитоза гистамина. При повышении концентрации цАМФ понижается проницаемость мембран тучных клеток для Ca^{2+} и сигнал антигена гасится.

Помимо актомиозиноподобных белков мембраны определенной роль в процессах секреции играют цитоплазматические белки, формирующие цитоскелет. Так, например, митотические яды (колхицин, винбластин, цитохалазин В), вызывающие разрушение микротрубочек и микрофиламентов, тормозят выход катехоламинов из мозгового слоя надпочечников, тироксина из щитовидной железы, гистамина из тучных клеток, инсулина из β -клеток поджелудочной железы. В клетке процессы полимеризации-деполимеризации тубулина, формирующего микротрубочки, находятся под контролем Ca^{2+} и циклических нуклеотидов.

Поступив в кровь, гормоны связываются с так называемыми «транспортными» белками. Это название, закрепившееся за специфическими белками крови, нельзя понимать буквально. Белки крови не транспортируют гормон. Они только связывают его, тем самым защищая от разрушения и экскреции. В связанной форме гормон с током крови переносится от места сек-

реции к клеткам-мишеням. В этих клетках есть рецепторы, которые имеют большее сродство к гормону, чем белки крови, поэтому молекула гормона может отщепиться от «транспортного» белка и присоединиться к рецептору.

Связывание с белками крови приводит к «забуфериванию» гормонов. Обычно лишь 5—10% молекул гормона находится в крови в свободном состоянии. Лишь эти свободные молекулы могут взаимодействовать с рецептором. Однако как только они свяжутся с рецептором, равновесие в реакции взаимодействия гормона с «транспортными» белками сдвинется в сторону распада комплекса и концентрация свободных молекул гормона останется практически неизменной.

Связывание гормонов в крови зависит от их сродства к связывающим белкам и концентрации этих белков. У специфических гормонсвязывающих белков крови константа связывания K_s равна 10^7 — 10^9 M^{-1} . К числу таких белков относятся транскортин, связывающий кортикостероиды, тестостерон-эстрогенсвязывающий глобулин, тироксинсвязывающий глобулин, тироксинсвязывающий преальбумин и т. д. Едва ли не все гормоны могут связываться с альбумином, концентрация которого в крови в 1000 раз больше, чем концентрация других гормонсвязывающих белков. Однако сродство к альбумину у гормонов в десятки тысяч раз меньше, поэтому с альбуминами обычно связано 5—10% гормонов, а со специфическими белками — 85—90%. Альдостерон, по-видимому, не имеет специфических «транспортных» белков, поэтому находится преимущественно в связи с альбумином.

Концентрация гормонсвязывающих белков в крови может зависеть от функционального состояния организма, прежде всего от гуморальных факторов регуляции. Так, например, тиреоидные гормоны индуцируют образование тестостерон-эстрогенсвязывающего глобулина и транскортина.

При определенных условиях специфические гормонсвязывающие белки крови по ряду свойств могут приближаться к рецепторам (см. раздел 4.3). Однако они никак не приобретают способности трансформировать процесс связывания гормона в биологический эффект, т. е. не оказывают того действия, которое присуще гормональному рецептору. Эти белки отличаются от ре-

цепторов и по целому ряду других признаков (например, молекулярный вес, структура).

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Ашмарин И. П. Загадки и откровения памяти. Л., Изд-во Ленингр. ун-та, 1975.

Берн Г. Функции химических передатчиков вегетативной нервной системы. М., ИЛ, 1961.

Вундер П. А. Эндокринология пола. М., Наука, 1980.

Буданцев А. Ю. Моноаминергические системы мозга. М., Наука, 1976.

Глебов Р. Н., Крыжановский Г. Н. Функциональная биохимия синапсов. М., Медицина, 1978.

Кометиани П. А., Алексидзе Н. Г., Клейн Е. Э. Нейрохимические аспекты памяти. Тбилиси, 1980.

Лукнер М. Вторичный метаболизм у микроорганизмов, растений и животных. М., Мир, 1979.

Матюшкин Д. П. О функциональных обратных связях в синапсе. Л., Изд-во Ленингр. ун-та, 1975.

Нейрохимия / Под ред. М. И. Прохоровой. Л., Изд-во Ленингр. ун-та, 1979.

Blackwell R. E., Guillemin R. Hypothalamic control of adenohipophyseal secretions. — *Ann. Rev. Physiol.*, 1973, vol. 35, p. 357—390.

Calcium in biological systems / Ed. C. J. Duncan. Cambridge, 1976.

Calcium transport in contraction and secretion / Eds. E. Carafoli, F. Clementi, W. Drabikowsky, A. Margreth. Amsterdam, 1975.

Endorphins / Eds. L. Graf, M. Palkovits, A. Z. Ronai. Budapest, 1978.

Franchimont P. Pituitary gonadotropins. — *Clin. Endocrinol. Metab.*, 1977, vol. 6, p. 101—116.

Glucagon and its role in Physiology and clinical medicine / Eds. P. P. Foa, J. S. Bajaj, N. L. Foa. Berlin, 1978.

Gut hormones / Eds. S. R. Bloom, M. I. Grossman. Edinburgh, 1978.

Handbook of Physiology, Sect. 7, Endocrinology / Eds. M. A. Greer, D. H. Solomon. Washington, 1974.

Peptide hormones / Ed. J. A. Parsons. Baltimore, 1976.

Recent results in peptide hormone and androgenic steroid research / Ed. F. A. Laszlo. Budapest, 1979.

Steer M. L., Atlas D., Levitzki A. Interrelations between β -adrenergic receptors, adenylate cyclase and calcium. — *New England J. of Medicine*, 1975, vol. 292, p. 409—414.

The Pharmacological Basis of Therapeutics, Sect. 15. Hormones and hormone antagonists / Eds. A. G. Gilman, M. Goodman, A. Gilman. New York, 1980, p. 1367—1550.

Zatz M. The pineal gland: shedding light on the internal clock. — *Trends in Pharmacol. Sci.*, 1980, vol. 1, N 9, p. 230—233.

Vande Wiele R. L., Dyrenfurth I. Gonadotropin — steroid interrelationships. — *Pharmacol. Rev.*, 1973, vol. 25, p. 189—207.

ГЛАВА 3

РЕЦЕПЦИЯ ГОРМОНОВ

Рецепторами называют специфические структуры клетки, связывание с которыми — обязательное условие для проявления эффекта внеклеточного биологически активного вещества. Рецепторы обладают высоким сродством и избирательностью к этим веществам, но могут связывать также их структурные аналоги. Вещества, имитирующие действие гормонов, называют агонистами или миметиками (от слова «мимикрия» — подражание). Вещества, которые, связываясь с рецептором, сами не вызывают биологического эффекта, но препятствуют связыванию гормона, называют антагонистами или литиками (от слова «лизис» — растворение, устранение). Связывание природных веществ, их агонистов или антагонистов с рецепторами происходит быстро и обратимо. После связывания и отщепления от рецептора вещество остается неизменным.

Связывание гормона с «чужим» рецептором может завершаться образованием гормон-рецепторного комплекса, который не вызывает биологического эффекта. Подобные случаи редки. Достоверно показано это только для половых гормонов — эстрогены, связываясь с рецепторами андрогенов, не вызывают физиологического ответа ткани, но конкурентно препятствуют действию андрогенов.

Почти все известные в настоящее время антагонисты либо получены из растительных и бактериальных объектов, либо синтезированы в лаборатории. В ряде случаев вещества одного животного организма могут блокировать рецепторы другого, как, например, бунгаротоксин из змеиного яда — известный ингибитор холинэргических рецепторов.

3.1.

СТРУКТУРА ГОРМОНОВ И ТИПЫ РЕЦЕПТОРОВ

Каждый гормон связывается со своим специфическим рецептором. В одной и той же клетке (и даже в одной и той же мембране клетки) может быть более

десятка разных типов рецепторов. Связывание каждого гормона с рецептором — процесс, как правило, независимый от состояния других рецепторов. Известно, что существует антагонизм между адренергической и холинергической регуляцией, между инсулином и глюкагоном, либериными и статинами и т. д. Этот антагонизм наблюдается лишь на стадии реализации гормонального сигнала в физиологический ответ клетки и, как правило, не затрагивает первичных процессов формирования гормонального сигнала.

Гормоны, близкие по химической структуре, могут связываться с одним и тем же рецептором. Так, например, оба гормона задней доли гипофиза — антидиуретический гормон, регулирующий транспорт Na^+ и воды в почках, и окситоцин, действующий на гладкие мышцы сосудов и матки, — являются октапептидами близкой структуры (см. раздел 2.1), различающимися между собой лишь двумя аминокислотными остатками (в 3-м и 8-м положениях пептидной цепи). При концентрациях, в 10 раз превышающих физиологические, окситоцин может связываться в мозговом слое почек с рецепторами антидиуретического гормона и тем самым препятствовать потере организмом Na^+ и воды. В свою очередь, антидиуретический гормон при высоких концентрациях может активировать рецепторы окситоцина и таким образом влиять на секреторную активность молочной железы, на сократимость матки и просвет кровеносных сосудов. В организме животного концентрации этих гормонов таковы, что антидиуретический гормон может связываться только со «своими» рецепторами, регулируя работу почек и не влияя на матку и сосуды, а окситоцин контролирует работу гладкой мускулатуры, не вмешиваясь в процессы фильтрации, происходящие в почках.

При концентрациях, в десятки раз превышающих физиологические, инсулин может связываться с рецепторами соматомединов и влиять, например, на превращение пролина в оксипролин или усиливать включение сульфата в мукополисахариды, образующие хрящевую ткань, т. е. оказывать эффекты, свойственные соматомединам.

При высоких концентрациях лютеотропный гормон может связываться с рецепторами фолликулостимулирующего гормона, а фолликулостимулирующий — с ре-

цепторами лютеотропного. Во всех случаях физиологический ответ определяется типом рецепторов, с которыми произошло связывание.

В молекуле любого гормона есть группы, ответственные за связывание с рецептором, и группы, ответственные за проявление биологического эффекта. Устранение последних превращает гормон в его антагонист. Так, в частности, отщепление от глюкагона, состоящего из 29 аминокислотных остатков, N-концевого гистидина превращает гормон в полипептид, способный с высоким родством и специфичностью связываться с рецепторами глюкагона, но неспособный вызывать биологические эффекты, свойственные глюкагону. В тканях животных, как мы отмечали, подобные превращения гормонов в их антагонисты обычно не происходят.

Известны случаи, когда отщепление от белкового гормона значительной части полипептидной цепи или модификация определенных аминокислотных остатков приводит к резкому снижению родства к рецепторам, но не устраняет способности активировать рецептор. Так, например, отщепление от глюкагона или АКТГ C-концевых окта- или декапептидов не лишает гормоны биологической активности.

В молекуле АКТГ, состоящей из 39 аминокислотных остатков (рис. 38), наиболее важной является последовательность 4—10: мет-глю-гис-фен-арг-тре-гли. Эта же аминокислотная последовательность встречается в составе β -липотропина, α - и β -меланоцитстимулирующих гормонов (см. рис. 27). Общие аминокислотные последовательности имеют и другие белково-пептидные гормоны. Предполагается, что каждая группа этих гормонов возникла из общего предшественника. Появление нескольких гормонов со сходной структурой объясняется дивергенцией, наступившей вследствие мутаций и дупликаций генов, их разделения или «слияния». Параллельно с эволюцией структуры гормонов изменялись и гормональные рецепторы. Представляется весьма вероятным, что рецепторы каждой группы (антидиуретического гормона и окситоцина; АКТГ, β -липотропина и меланоцитстимулирующих гормонов; лютеинизирующего, фолликулостимулирующего и тиреотропного гормонов; глюкагона и секретина) в процессе эволюции произошли от общих рецепторов-предшественников.

Та часть молекулы, которая обеспечивает проявление гормонального эффекта, называется эффекторным участком гормона. Эволюционно это наиболее консервативная структура. Общий гептапептид, входящий в структуру АКТГ, β -липотропина и меланоцитстимулирующих гормонов, является именно эффекторным участком в молекуле каждого из этих гормонов.

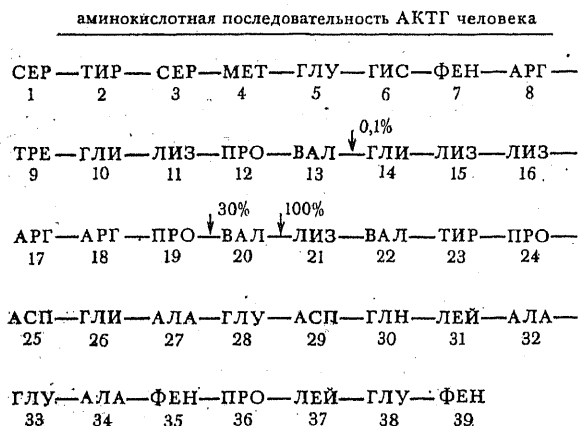


Рис. 38. Аминокислотная последовательность АКТГ человека. Стрелками показаны участки, в которых проводился гидролиз пептидной цепи. Цифры около стрелок указывают биологическую активность N-концевого фрагмента в процентах от биологической активности нативной молекулы АКТГ

Далеко не всегда эффекторный участок молекулы гормона построен из аминокислотных остатков, расположенных по соседству в первичной структуре молекулы. Многие белково-пептидные молекулы обладают вторичной, третичной и даже четвертичной структурой. Поэтому остатки, отдаленные друг от друга в первичной структуре, могут быть сближены вследствие сложного пространственного расположения пептидной цепи. Именно этим, по-видимому, объясняется тот факт, что у молекулы ангиотензина-II эффекторными являются 1—3-й и 8-й аминокислотные остатки, а у лютеинизирующего, фолликулостимулирующего и тиреотропного гормонов эффекторная часть сформирована определенными участками β -субъединиц и C-концевым участком α -субъединиц.

Все же можно отметить определенную закономерность: у многих белково-пептидных гормонов эффекторный участок расположен в N-концевой части молекулы. Нередко эффекторной является N-концевая аминокислота, например гистидин у глюкагона, аланин у паратгормона, пироглутаминовая кислота у гонадолиберина и т. д. Это наблюдение интересно в связи с тем, что многие гормоны и нейромедиаторы, образующиеся из аминокислот (катехоламины, гистамин, серотонин, γ -аминомасляная кислота и др.), содержат аминокислотную группу, которая играет решающую роль в проявлении их биологических эффектов.

Те участки молекулы гормона, через которые осуществляется связывание с рецептором, называются адресными. Эти участки эволюционно менее консервативны, чем эффекторные. Изменение их структуры происходило, вероятно, параллельно с появлением новых типов рецепторов. Высокое сродство к рецепторам и высокая специфичность связывания, по-видимому, объясняются тем, что адресный участок чаще всего составляет существенную часть молекулы гормона. Так, например, у глюкагона это 2—27-й, у паратгормона 2—29-й, а у октапептида ангиотензина-II 3—6-й аминокислотные остатки.

У стероидных гормонов трудно выделить определенные группировки, ответственные за связывание с рецептором и за проявление биологических эффектов. У этих гормонов решающую роль играет, по-видимому, форма молекулы, которая может существенно изменяться при самых незначительных модификациях структуры (рис. 39).

У тиреоидных гормонов первое бензольное кольцо, очевидно, является эффекторным, а второе (наряду со свободными амино- и карбоксильной группами) — адресным участком молекулы (рис. 40).

Наряду с участками, важными для связывания с рецептором и для «активации» рецептора, существуют участки, модификация которых не влияет на эти свойства гормона. По мнению Ю. А. Панкова, видовая специфичность и иммунные свойства гормонов определяются прежде всего различиями аминокислотных последовательностей именно в «менее важной» части молекулы гормона. Такие участки называют вспомогательными. Они могут играть решающую роль в стабилизации

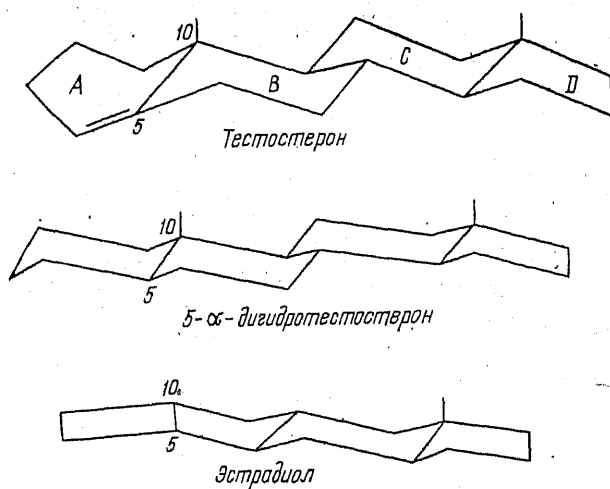


Рис. 39. Стерическая структура некоторых стероидных гормонов

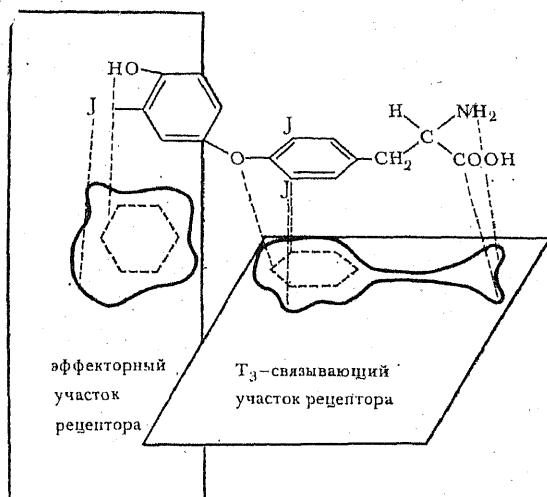


Рис. 40. Роль разных участков молекулы трийодтиронина (T_3) в связывании с рецептором и проявлении биологического эффекта

ции молекулы, в ее переносе с током крови или лимфы, а также в контроле за доступностью разных тканей для гормона.

Так, например, после разрыва S—S-связей, соединяющих две полипептидные цепи в молекуле инсулина, биологические свойства гормона полностью исчезают. В то же время инсулин можно подвергнуть ограниченному протеолизу, а затем выделить пептидные фрагменты, которые, подобно нативному инсулину, способны ускорять транспорт глюкозы через мембрану. Инсулин, как и многие другие гормоны, переносится кровью не в свободном состоянии, а в связанном с белками плазмы. После секреции β -клетками инсулин сразу же с током крови попадает в печень, которая инактивирует около 40% молекул гормона. Если нарушена связь инсулина с β -глобулинами крови, печень может инактивировать весь секретируемый инсулин, следствием чего будет развитие диабета. Показано, что так называемые вспомогательные участки молекулы инсулина участвуют в связывании с белками плазмы и тем самым предохраняют гормон от инактивации.

Пятую часть молекулы фолликулостимулирующего гормона составляют сахара (см. табл. 1), важнейшим из которых является N-ацетилнейраминовая кислота. Отщепление части полипептидной цепи не приводит к инактивации гормона. В то же время, удаление этого сахара полностью лишает гормон биологической активности. Сама N-ацетилнейраминовая кислота не обладает биологической активностью. Ковалентно присоединяясь к белковой части молекулы, она, по-видимому, сообщает гормону именно ту конфигурацию, которая и «узнается» рецептором. Отщепление сахара от белковой части является, вероятно, биологическим механизмом инактивации этого гормона. При совместном введении фолликулостимулирующего гормона и N-ацетилнейраминовой кислоты биологическая активность гормона значительно возрастает, что может объясняться ингибирующим влиянием сахара на нейраминидазы.

Помимо типичных агонистов и антагонистов существуют также частичные агонисты. Эти вещества даже после полного насыщения рецепторов вызывают эффекты, менее выраженные, чем эффекты гормонов. Предполагается, что частичный агонист имеет одновременно два свойства — и агониста, и антагониста. К со-

жалению, в настоящее время нельзя ответить на вопрос, почему связывание вещества — обязательное, но недостаточное условие для перехода рецептора в активное состояние. Характеристика процессов, которые происходят с рецептором при связывании гормона — одна из актуальнейших задач молекулярной эндокринологии.

Количество разных рецепторов в клетках одного организма, по-видимому, больше, чем количество тех специфических регуляторов, которые образуются в этом организме, так как многие гормоны и нейромедиаторы действуют не через один, а через несколько типов рецепторов. При этом различия между рецепторами одного и того же гормона могут быть столь значительными, что не позволяют говорить об изоформах рецептора. Изоферменты катализируют одну и ту же химическую реакцию, но различаются по кинетическим константам и регуляторным свойствам (см. раздел 1.1). Разные рецепторы одного и того же гормона могут вызывать совершенно разные биологические эффекты и использовать для этого разные регуляторные механизмы. Так, например, адреналин, действуя через α -адренергические рецепторы, вызывает сокращение, а через β -адренергические рецепторы — расслабление кровеносных сосудов, мочевого пузыря и селезенки. Каким будет ответ ткани на адреналин — это определяется концентрацией адреналина и соотношением α - и β -адренергических рецепторов в клетках.

α -Адренергические рецепторы действуют на клетку путем повышения проницаемости мембран для Ca^{2+} , а β -адренергические — путем активации аденилатциклазы и последующего цАМФ-зависимого фосфорилирования белков. Оба типа рецепторов различаются также по сродству к агонистам и антагонистам. Для α -рецепторов характерен следующий ряд эффективности гормонов: норадреналин > адреналин > фенилэфрин > изопротеренол (рис. 41). Связывание этих гормонов с α -рецепторами блокируется фентоламином, дибензаминем и феноксibenзамином. Сродство гормонов к β -рецепторам убывает в следующем ряду: изопротеренол > адреналин > норадреналин > фенилэфрин. Специфическими антагонистами β -рецепторов является пиндолол, пропранолол и алпренолол (рис. 42).

Как α -, так и β -рецепторы катехоламинов существу-

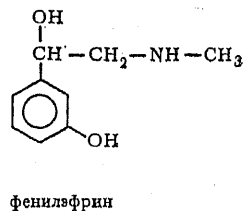
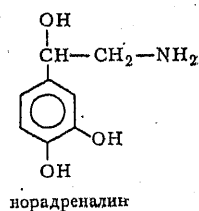
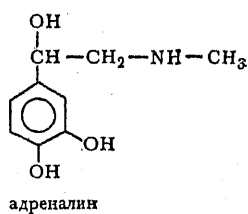
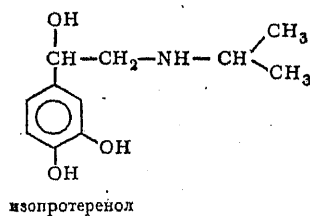
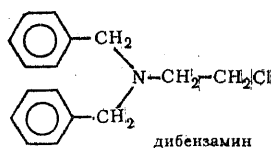


Рис. 41. Структура агонистов адренергических рецепторов

α -блокаторы



β -блокаторы

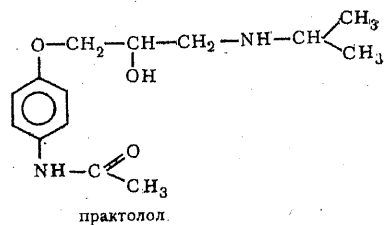
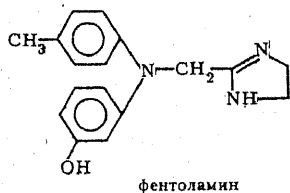
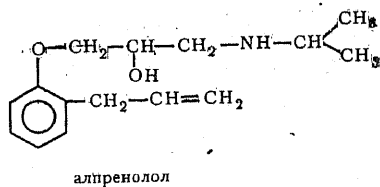
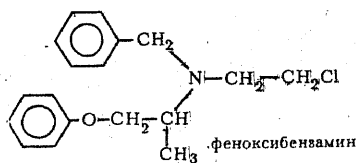
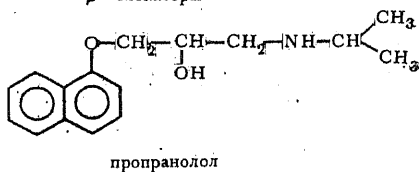


Рис. 42. Структура и классификация антагонистов адренергических рецепторов

ют в разных формах, обозначаемых α_1 , α_2 , β_1 и β_2 . Эти формы рецепторов различаются по сродству к гормонам и по чувствительности к антагонистам. Так, например, у β_1 -рецепторов, локализованных в сердце и жировой ткани, сродство к изопротеренолу лишь в 3—4 ра-

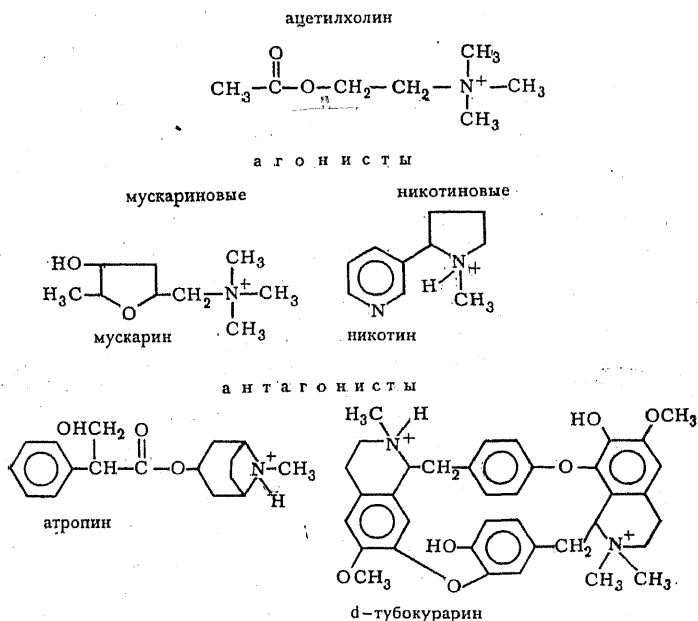


Рис. 43. Структура и классификация агонистов и антагонистов холинергических рецепторов

за выше, чем к норадреналину, а у β_2 -рецепторов, локализованных в скелетных мышцах, печени, легких и эритроцитах, сродство к изопротеренолу в 100 раз выше, чем к норадреналину. β_1 -Рецепторы блокируются практололом, а β_2 -рецепторы — бутоксамином.

Чем определяются различия между адренергическими рецепторами? Возможно, α - и β -рецепторы — два разных белка, имеющих похожие гормонсвязывающие участки и различные «эффекторные» участки, а α_1 и α_2 , β_1 и β_2 являются изоформами этих белков. Высказываются, однако, предположения, что α - и β -рецепторы могут «превращаться» друг в друга. Так, при высокой

температуре (25—37°С) катехоламины повышают силу и частоту сокращения сердца лягушки через типичные β -рецепторы. При понижении температуры до 5—15°С катехоламины вызывают тот же эффект через α -рецепторы — действие этих гормонов утрачивает чувствительность к β -антагонистам и начинает подавляться α -антагонистами. В опытах на мембранных препаратах из самых разных тканей таких «взаимопревращений» рецепторов не наблюдается — катехоламины активируют аденилатциклазу через типичные β -рецепторы во всем диапазоне температур. По-видимому, для «взаимопревращения» α - и β -рецепторов нужна целостность клеточной структуры, но возможно также, что при изменении температуры изменяется соотношение между функциональными активностями двух типов рецепторов.

Разные формы рецепторов обнаружены для ацетилхолина (никотиновые и мускариновые) (рис. 43), гистамина (H_1 и H_2) и других регуляторов. Подобно адренергическим, эти формы рецепторов также различаются сродством и специфичностью в отношении агонистов и антагонистов. Механизмы функционирования у них также разные.

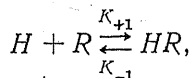
3.2.

ОБРАЗОВАНИЕ И РАСПАД ГОРМОН-РЕЦЕПТОРНОГО КОМПЛЕКСА

В настоящее время описаны десятки рецепторов для гормонов, нейромедиаторов, простагландинов, антигенов, антител, вирусов, бактериальных токсинов, бактериальных клеток и даже для малярийного плазмодия. В большинстве случаев рецепторы являются белками, чаще всего гликопротеидами. Известны и исключения. Так, например, рецептором холерного токсина является моносиалоганглиозид G_{M1} .

Закономерности связывания с рецепторами всех перечисленных выше агентов оказываются общими, поэтому для удобства в этом разделе мы будем использовать один термин — «гормон», подразумевая под ним любое биологически активное вещество, способное взаимодействовать с рецептором. Кинетика связывания гормона с рецептором определяется законом действующих масс. При увеличении концентрации гормона (H)

происходит его взаимодействие с рецептором (R) и образуется гормон-рецепторный комплекс (HR):



где K_{+1} и K_{-1} — константы скоростей соответственно ассоциации и диссоциации гормон-рецепторного комплекса. K_{+1} — константа реакции второго порядка. Она имеет размерность $M^{-1} \cdot c^{-1}$. Величина K_{+1} определяется скоростью, с которой H и R «находят» друг друга, ориентируются определенным образом и связываются с образованием активного комплекса HR . K_{-1} — константа реакции первого порядка. Она имеет размерность c^{-1} или мин^{-1} и находится в обратной зависимости от прочности связей, образовавшихся между гормоном и рецептором.

Рассмотрим простейший случай, когда одна молекула гормона соединяется с одной молекулой рецептора, а концентрация гормона значительно превышает концентрацию рецептора. Скорость образования комплекса HR (K_{+1}) пропорциональна концентрации $[H]$ и концентрации свободных рецепторов $[R] = ([R_0] - [HR])$, где R_0 — общее число рецепторов в ткани (исходная концентрация):

$$v_{+1} = K_{+1}[H]([R_0] - [HR]).$$

Скорость диссоциации гормона от рецептора пропорциональна концентрации гормон-рецепторного комплекса $[HR]$:

$$v_{-1} = K_{-1}[HR].$$

По мере накопления комплекса HR прямая реакция будет замедляться, а обратная — усиливаться, и спустя какое-то время наступит динамическое равновесие, при котором скорость образования комплекса HR будет равна скорости его распада ($v_{+1} = v_{-1}$). Следовательно,

$$K_{+1}[H]([R_0] - [HR]) = K_{-1}[HR].$$

Обозначим отношение констант прямой и обратной реакции $K_{+1}/K_{-1} = K_c$ — константой сродства (она же — константа ассоциации или связывания). Эта константа характеризует соотношение между занятыми гормоном

и свободными от гормона рецепторами в условиях равновесия:

$$K_c = \frac{K_{+1}}{K_{-1}} = \frac{[HR]}{[H]([R_0] - [HR])}$$

Отсюда видно, что концентрация гормон-рецепторного комплекса

$$[HR] = K_c [H] ([R_0] - [HR])$$

пропорциональна константе сродства, концентрациям молекул гормона и свободных рецепторов. Доля рецепторов, занятых гормоном, равна

$$\frac{[HR]}{[R_0]} = K_c [H] \left(1 - \frac{[HR]}{[R_0]} \right).$$

Разделив обе части уравнения на $[HR]/[R_0]$, получаем

$$\frac{[R_0]}{[HR]} \cdot K_c \cdot [H] = K_c [H] + 1,$$

или

$$\frac{[HR]}{[R_0]} = \frac{K_c [H]}{1 + K_c [H]}.$$

Используя вместо константы сродства K_c обратную ей величину — константу диссоциации $K_d = K_{-1}/K_{+1}$, получаем

$$\frac{[HR]}{[R_0]} = \frac{[H]}{K_d + [H]}.$$

Это уравнение аналогично классическому уравнению Михаэлиса — Ментен, предложенному для описания кинетики взаимодействия субстрата с ферментом, когда продукт не образуется:

$$\frac{[ES]}{[E_0]} = \frac{[S]}{K_s + [S]},$$

где $[S]$ — концентрация субстрата, $[E_0]$ — общая концентрация фермента, $[ES]$ — концентрация фермент-субстратного комплекса, а K_s — константа диссоциации фермент-субстратного комплекса.

Полученные нами уравнения математически описывают процесс насыщения, который называют также изотермой связывания или изотермой Лангмюра. Как мы увидим позже, в биологическом эксперименте чаще

всего изучается зависимость образования гормон-рецепторного комплекса от концентрации гормона, поэтому преобразуем уравнение:

$$[HR] = \frac{[H][R_0]}{K_d + [H]} = \frac{K_c [H][R_0]}{1 + K_c [H]}.$$

Горизонтальной асимптотой кривой, описываемой этими уравнениями, будет $[HR] = [R_0]$. Из уравнения следует, что насыщение гормоном половины рецепторов $[HR] = 1/2 \cdot [R_0]$ произойдет при концентрации гормона, равной K_d .

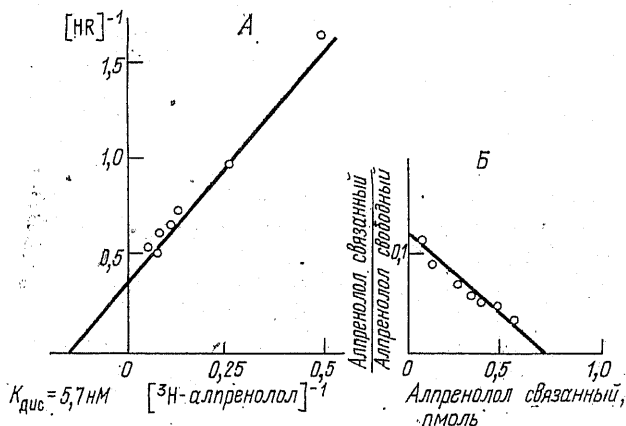


Рис. 44. Специфическое связывание алпренолола с β -адренергическими рецепторами сердца кролика: А — двойные обратные величины (координаты Лайнуивера—Бэрка); Б — график Скэтчарда

Для нахождения K_d , которая характеризует сродство гормона к рецептору, как и в случае ферментативной кинетики, можно прибегнуть к координатам Лайнуивера—Бэрка:

$$\frac{1}{[HR]} = \frac{K_d + [H]}{[H][R_0]} = \frac{K_d}{[H][R_0]} + \frac{[H]}{[H][R_0]},$$

$$\text{или} \quad \frac{1}{[HR]} = \frac{K_d}{[R_0]} \cdot \frac{1}{[H]} + \frac{1}{[R_0]}.$$

В этих координатах гиперболическая зависимость преобразуется в линейную ($1/[HR]$ от $1/[H]$), и мы получаем график (рис. 44) с наклоном $K_d/[R_0]$, который

отсекает на оси ординат $1/[R_0]$, а на оси абсцисс — $-1/K_d = -K_c$.

Зависимость образования гормон-рецепторного комплекса от концентрации гормона чаще всего анализируется с помощью графика Скэдчарда.

$$\text{Поскольку } \frac{[HR]}{[R_0]} = \frac{[H]}{K_d + [H]},$$

$$\text{то } [HR] (K_d + [H]) = [H] [R_0],$$

$$\text{или } [HR] \cdot K_d = -[HR] [H] + [H] [R_0].$$

Разделив обе части уравнения на $[H] \cdot K_d$, получаем

$$\frac{[HR]}{[H]} = -\frac{1}{K_d} \cdot [HR] + \frac{[R_0]}{K_d}.$$

Это уравнение характеризует линейную зависимость между отношением количества связавшихся и свободных молекул гормона и концентрацией гормон-рецепторного комплекса. График этой зависимости представляет собой прямую линию с наклоном $-1/K_d = -K_c$, которая отсекает на оси ординат величину $[R_0]/K_d$, а на оси абсцисс $[R_0]$ (рис. 45).

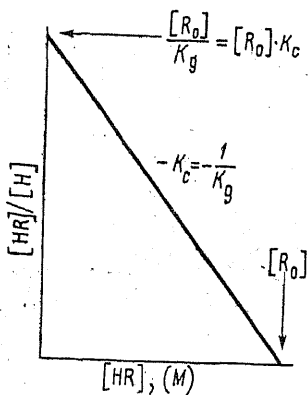


Рис. 45. Вид графика Скэдчарда при некооперативном связывании лиганда с одним типом связывающих участков

При использовании гормонов, меченных радиоактивными изотопами, данный методический прием позволяет определить молярную концентрацию рецепторов в биологическом материале, а также количество молекул рецептора в клетке. В последнем случае пользуются следующим уравнением:

$$n = \frac{[R_0] \cdot 6,022 \cdot 10^{23}}{\text{количество клеток в 1 л}},$$

где n — число гормонсвязывающих участков в клетке, а $6,022 \cdot 10^{23}$ — число Авогадро, равное числу молекул в одном моле вещества.

Рассмотренные кинетические приемы применимы в том случае, если с одной молекулой рецептора связы-

вается одна молекула гормона и это связывание происходит независимо от состояния других рецепторов (иными словами, связывание с одной молекулой рецептора не влияет на гормонсвязывающие свойства других молекул рецептора). Для многих гормонов (гонадотропинов, пролактина, гормона роста) показано, что про-

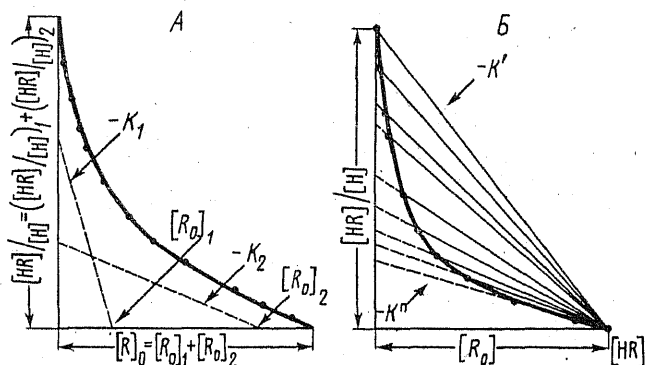


Рис. 46. Анализ нелинейного графика Скэтчарда: А — при связывании гормона с двумя рецепторами (R_1 и R_2), различающимися сродством к гормону (K_1 и K_2 — соответствующие константы сродства). Пунктирными линиями показаны касательные к кривой, каждая из которых отражает взаимодействие гормона лишь с соответствующим рецептором; Б — при кооперативном характере связывания гормона с рецептором (K' и K'' — константы сродства соответственно при связывании с рецептором первых молекул гормона и при полном насыщении гормонсвязывающих участков рецептора молекулами гормона)

цесс связывания с рецептором действительно подчиняется простой кинетике Михаэлиса. Однако нередки случаи, когда в одной и той же клетке или субклеточной структуре есть два типа гормонсвязывающих участков, различающихся по сродству к гормону. В результате этого при увеличении концентрации гормона происходит одновременное титрование как участков с высоким, так и участков с низким сродством. На графике Скэтчарда характер такого связывания имеет вид кривой, вогнутой в сторону основания координат (рис. 46 А). В этом случае определить кинетические константы можно, проведя касательные к начальной и конечной фазе кривой.

Изогнутый вид кривой на графике Скэтчарда может свидетельствовать также о кооперативности процесса связывания гормона с рецептором (рис. 46 Б). В этом случае два разных по сродству участка связывания не предсуществуют. Если в одной молекуле рецептора есть несколько гормонсвязывающих участков (исходно с

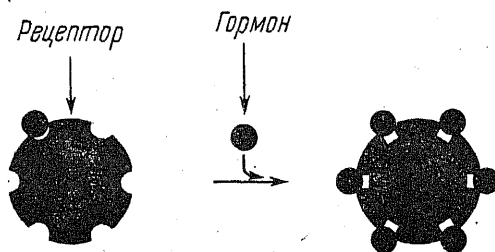


Рис. 47. Графическое изображение структуры гормон-связывающих участков рецептора, испытывающего отрицательное кооперативное влияние гормона

одинаковым сродством) или несколько рецепторов объединено в единый олигомерный комплекс, то связывание первых молекул гормона может индуцировать изменение сродства к другим молекулам гормона (подобно связыванию кислорода с гемоглобином, см. раздел 1.1) (рис. 47). Выяснение причин аномального поведения кривых на графике Скэтчарда обычно проводят с помощью графика Хилла.

Как известно, в случае кооперативного связывания уравнение Михаэлиса приобретает показатель степени n , который равен числу взаимодействующих участков:

$$\frac{[HR]}{[R_0]} = \frac{K_c [H]^n}{1 + K_c [H]^n}.$$

Это выражение можно записать следующим образом:

$$1 - \frac{[HR]}{[R_0]} = \frac{1 + K_c [H]^n - K_c [H]^n}{1 + K_c [H]^n}.$$

Разделив первое уравнение на второе, мы получим:

$$\frac{[HR]}{[R_0] - [HR]} = K_c [H]^n,$$

$$\log \frac{[HR]}{[R_0] - [HR]} = n \log [H] + \log K_c.$$

Отложив левую часть уравнения на оси ординат, а правую — на оси абсцисс, можно построить график Хилла (рис. 48). Тангенс угла наклона линии на этом графике равен величине n (количество взаимодействующих

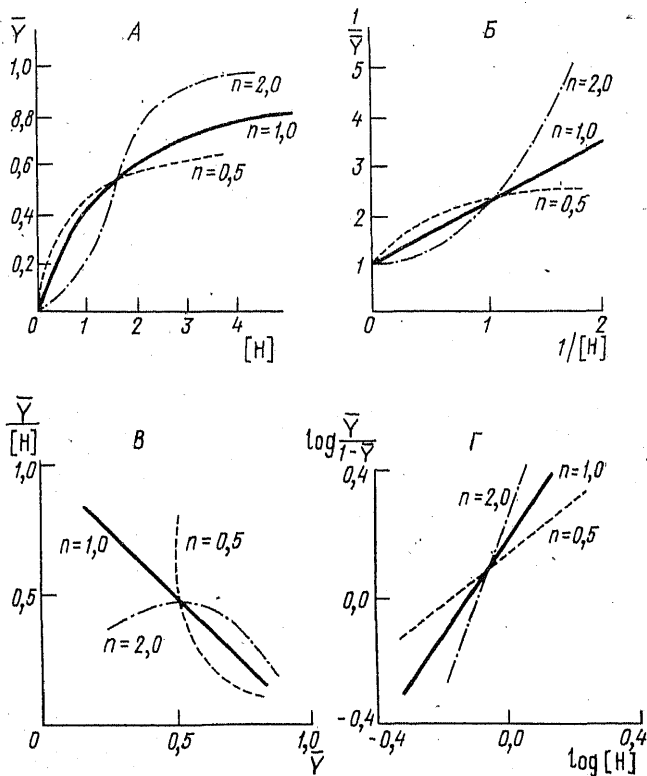


Рис. 48. Характер зависимости связывания от концентрации гормона при некооперативном ($n=1$), положительном ($n=2$) и отрицательном ($n=0,5$) кооперативном влиянии гормона на рецептор: $\bar{Y}=[HB]/[R_0]$ — степень оккупации рецептора гормоном; А — прямые координаты; Б — двойные обратные величины; В — график Скэтчарда; Г — график Хилла

участков). На оси абсцисс отсекается участок, равный $\frac{\log K_c}{n}$. Если $n=1$, значит связывание некооперативно, если $n>1$, связывание гормона имеет положительную, а $n<1$ — отрицательную кооперативность.

Анализировать в координатах Хилла можно только средний участок кривой связывания. При приближении величины $[HR]/[R_0]$ к нулю или к единице на графике Хилла могут наблюдаться большие искажения, что и приводит часто к неправильным заключениям о кооперативности связывания.

Отметим также, что в случае одновременного связывания гормона с несколькими участками, различающимися по константам сродства (см. рис. 46А), анализ кривых титрования в координатах Хилла может показать (в силу известной ошибки биологического эксперимента) несуществующую кооперативность. Полученное в эксперименте отличие коэффициента Хилла от единицы — условие обязательное, но недостаточное для заключения о кооперативности процесса связывания.

В последние годы Де Мейтсом предложен принципиально иной подход к изучению кооперативного связывания. Поскольку взаимодействие с рецептором — процесс обратимый, то при инкубации с меченым гормоном спустя какое-то время в системе будет достигнуто равновесие. При этом часть рецепторов будет свободной, а другая — меченой связавшимся гормоном. Поскольку это равновесие динамическое (с одинаковой скоростью идет и образование, и распад комплекса HR), то после разведения инкубационной среды в 100 раз равновесие резко сдвинется в сторону диссоциации комплекса HR , так как обратный процесс — связывание H с R — будет подавлен понижением концентрации свободного гормона. Что произойдет, если одновременно с разведением в среду будет внесен большой (100—1000-кратный) избыток того же гормона, но не радиоактивного? В обмен на диссоциировавшую меченую молекулу гормона с рецептором будет связываться немеченая молекула гормона (поскольку немеченых молекул стало во много раз больше, чем меченых), поэтому скорость отщепления радиоактивных молекул от рецептора останется той же, что и в случае разведения без внесения избытка немеченого гормона.

Иное мы будем наблюдать в случае кооперативности. Если между участками связывания гормонов существует взаимодействие, то оккупация этих участков нерадиоактивными молекулами гормона будет влиять на отщепление радиоактивных молекул от рецептора. При положительной кооперативности внесение избытка

гормона одновременно с разведением среды замедлит, а при отрицательной кооперативности — ускорит распад «меченого» гормон-рецепторного комплекса (рис. 49).

Сочетание двух этих подходов (методов Хилла и Де Мейтса) позволяет получать достаточно убедительный ответ на вопрос о кооперативности связывания гормона с рецептором. Отрицательная кооперативность обнаружена у рецепторов инсулина практически во всех исследованных тканях. Сообщалось также об отрицательном кооперативном связывании катехоламинов с β -адренергическими рецепторами эритроцитов лягушки, хотя в других объектах β -рецепторы, вероятно, не обладают кооперативными свойствами. Предполагается, что отрицательная кооперативность свойственна тем рецепторам, которые образуют кластеры (см. раздел 3.4) или олигомерные комплексы. Нельзя исключить также, что этот эффект связан с существованием нескольких взаимодействующих участков связывания гормонов в одной молекуле рецептора.

Обычно распад гормон-рецепторного комплекса в клетке происходит за счет понижения концентрации свободных молекул гормона в пространстве, окружающем рецептор. При этом равновесие в реакции сдвигается в сторону диссоциации молекул гормона от рецептора. В ряде случаев существуют специальные механизмы понижения концентрации свободных молекул гормона (например, так называемый «обратный захват» катехоламинов, осуществляемый специальными структурами клетки), но в основном устранение молекул гормона, не связавшихся с рецептором, осуществляют ферменты, разрушающие этот гормон.

Разрушение гормона может происходить в самой клетке-мишени. Так, например, после выброса ацетилхолина и связывания с холинергическим рецептором происходит быстрое разрушение этого нейромедиатора

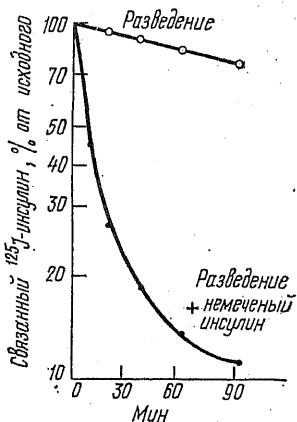


Рис. 49. Влияние немеченого инсулина на диссоциацию от рецептора меченого инсулина, меченного йодом (объяснение см. в тексте)

ацетилхолинэстеразой, локализованной в постсинаптической мембране, а также, по-видимому, в самой синаптической щели. Такое разрушение происходит, по-видимому, со все возрастающей скоростью, так как данному ферменту свойственно субстратное торможение. В момент выброса медиатора эстераза, очевидно, ингибируется высокой концентрацией субстрата (10^{-4} — 10^{-3} М) и поэтому «пропускает» ацетилхолин к рецептору. Затем начинается все ускоряющийся гидролиз ацетилхолина, который приводит к понижению концентрации последнего в синаптической щели ниже 10^{-5} М. Поскольку константа диссоциации холинэргического рецептора для ацетилхолина равна 10^{-5} М, происходит отщепление медиатора от рецептора. Такая «согласованная» работа рецептора и фермента позволяет сигналу развиваться и гаснуть в течение долей миллисекунды. Следует отметить, что определенную роль в этом процессе может играть и диффузия медиатора из синаптической щели.

Гормоны белковой природы также могут инактивироваться клетками-мишенями. Эта инактивация часто начинается на плазматической мембране, которая имеет высокоспецифичные протеазы.

Стероидные гормоны могут окисляться, восстанавливаться или гидроксилироваться, а тиреоидные — дейодироваться на мембранах эндоплазматического ретикулаума клеток-мишеней. Важную роль в гормональной регуляции играют почки и печень, понижающие концентрацию гормонов в крови и лимфе путем экскреции с мочой и желчью (см. раздел 2.2).

После понижения концентрации гормона скорость распада комплекса HR определяется константой скорости диссоциации гормона от рецептора (K_{-1}). Эта константа, как известно, зависит от природы связей, образующихся между двумя агентами. Нейромедиаторы, т. е. те соединения, которые секретируются в специальные морфологические структуры, образованные двумя клетками и называемые синапсами (см. рис. 37), диссоциируют от рецептора за доли миллисекунды. Связывание медиаторов с рецепторами также происходит очень быстро.

Типичные гормоны (т. е. такие специфические регуляторы, которые поступают в кровь и лимфу и только затем с током крови и лимфы на клетки-мишени) дис-

социируют от рецепторов за десятки секунд и даже минут. Низкие скорости диссоциации от рецепторов свойственны прежде всего гормонам сложной белковой природы, а также стероидным и тиреоидным гормонам. Это естественно, если учесть необычайно высокое сродство таких гормонов к рецепторам, которое составляет 10^{-9} — 10^{-11} М.

3.3.

ПРОБЛЕМЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ РЕЦЕПТОРОВ

Концентрация рецепторов в клетке крайне низка. Обычно она составляет $(0,1—0,5) \cdot 10^{-12}$ молей на 1 мг белка. В клетках крови число β -адренергических рецепторов порядка 1000 молекул на клетку. Для получения мембранного рецептора в гомогенном виде необходима очистка в 200—500 тысяч раз. Выделение рецепторов затруднено также тем, что после разрушения клеток, выделения и очистки субклеточных структур рецепторы, локализованные в этих структурах, нельзя тестировать по их биологическим эффектам, так как в большинстве случаев биологический эффект опосредуется согласованной работой многих структур, а подчас и вовсе требует целостности клетки или даже определенного многоклеточного ансамбля. Так, например, после получения очищенной фракции плазматических мембран α -адренергические рецепторы не удается тестировать по повышению проницаемости этих мембран для Ca^{2+} , так как такие мембраны обычно становятся свободно проницаемыми для всех ионов. Тестировать β -адренергические рецепторы по ускорению липолиза нельзя после разрушения жировой ткани и выделения мембран. Однако эти мембраны содержат аденилатциклазу, активация которой является первым этапом в процессах ускорения липолиза β -адренергическими агонистами. Тестируя β -рецепторы по активации аденилатциклазы, можно выделить и очистить плазматическую мембрану, в которой локализованы и β -рецепторы и аденилатциклаза. Следующим этапом должна быть солюбилизация мембраны детергентами или органическими растворителями, так как практически все мембранные рецепторы — интегральные белки мембраны. После солюбилизации аденилатциклаза сохраняет свою активность,

но утрачивает способность активироваться гормонами, поэтому при дальнейшей очистке рецепторов уже не удается проводить «функциональный» контроль.

Основной метод идентификации рецепторов в клетках или субклеточных структурах (и практически единственный, применяемый при очистке рецепторов) — измерение связывания агониста или антагониста. Этот метод имеет ряд особенностей и требует соблюдения

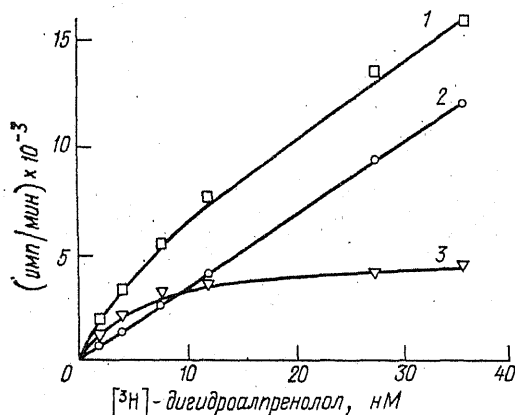


Рис. 50. Связывание меченого ди-гидроалпренолола с мембранами сердца кролика в отсутствие немеченого алпренолола (линия 1) и в присутствии 10^{-5} М немеченого алпренолола (линия 2). Специфическое связывание (линия 3) рассчитано по разности этих двух экспериментальных кривых

некоторых предосторожностей, поэтому рассмотрим его несколько подробнее.

Биологически активное вещество может связываться с клеткой специфически и неспецифически. Неспецифическое связывание представляет собой сорбцию на определенных структурах клетки (например, встраивание гидрофобных молекул вещества в липидный бислой) и имеет линейную зависимость от концентрации вещества (рис. 50). Специфическое связывание происходит за счет комплементарного взаимодействия лиганда с определенными молекулами клетки, количество которых ограничено. Такими молекулами могут быть ферменты, участвующие в метаболизме данного вещества, или рецепторы, опосредующие действие данного вещества на клетку. Специфическое связывание протекает по кинетике с насыщением (см. рис. 50). Это быстрый и обратимый процесс. В отличие от неспецифического такое связывание блокируется химическими

аналогами данного вещества. Если существуют два стереоизомера вещества, то один из них, как правило, связывается с рецепторами и ферментами гораздо лучше другого. Для неспецифического связывания различия в стерической конфигурации веществ обычно не существенны.

В результате связывания с ферментом химическая структура вещества может изменяться (каталитическая реакция). Связывание с рецептором не приводит к изменению структуры вещества. Перечисленные особенности лежат в основе существующих ныне методов изучения взаимодействия веществ с рецепторами.

Поскольку концентрация рецепторов в клетке низка, в подавляющем большинстве случаев такое исследование проводят с веществами, мечеными радиоактивными изотопами. Если концентрация такого вещества увеличивается, то количество связанной радиоактивности будет возрастать. При низких концентрациях вещества происходит как специфическое, так и неспецифическое связывание. При определенных концентрациях вещества достигается насыщение всех специфических участков, после чего увеличение концентрации вещества будет приводить к росту только неспецифической сорбции, т. е. станет прямо пропорциональным концентрации исследуемого вещества (см. рис. 50). Экстраполировав этот линейный участок связывания в область низких концентраций вещества, мы можем определить, какая доля в общем связывании принадлежит специфическому и неспецифическому связыванию.

Чаще всего для определения доли специфического связывания в общем количестве связавшейся радиоактивности применяют 100—1000-кратный избыток нерадиоактивного того же вещества или его структурного аналога. Поскольку число специфических участков связывания ограничено, внесение в среду большого избытка нерадиоактивного аналога приведет к оккупации всех специфических участков нерадиоактивными молекулами, а радиоактивное вещество будет связываться только с неспецифическими участками. Предполагается, что внесение избытка аналога вещества не влияет на величину неспецифического связывания этого вещества. Поэтому, вычитая из общего связывания (до внесения аналога) неспецифическое связывание (после внесения аналога), определяют величину специфиче-

ского связывания вещества. В случае использования избытка того же, но нерадиоактивного вещества, рассуждают следующим образом. Радиоактивное вещество связывалось и специфически, и неспецифически (общее связывание). Внесение 1000-кратного избытка нерадиоактивного вещества в 1000 раз снизило связывание радиоактивности со специфическими участками, поэтому специфическим связыванием радиоактивности в данном случае можно пренебречь. Неспецифическое связывание при этом возросло в 1000 раз, так как между сорбцией и концентрацией вещества существует прямо пропорциональная зависимость. Вместе с тем, произошло 1000-кратное разведение радиоактивности нерадиоактивным материалом. В результате количество радиоактивного материала, связавшегося в присутствии 1000-кратного избытка нерадиоактивного вещества, будет равно неспецифическому связыванию радиоактивного вещества до внесения избытка этого вещества. Вычитая эту величину из величины общего связывания, определяют специфическое связывание радиоактивного вещества при данной его концентрации.

Следует отметить, что эти методические приемы (а лучших, к сожалению, в настоящее время нет) в ряде случаев могут ввести экспериментатора в заблуждение. Так, например, данный метод применим только в том случае, если нативное и меченное изотопом вещество связываются одинаково (причем, не только со специфическими, но и с неспецифическими участками). Это не всегда так. Например, включение в молекулу инсулина изотопа ^{125}I изменяет сорбционные свойства белковой молекулы, в результате чего «специфические» участки связывания инсулина можно обнаружить даже в таком материале, в котором исключено наличие рецепторов или других биологических структур (в стекле, тальке, бумаге).

Структуры клетки, на которых проводят опыты по связыванию гормонов, весьма неоднородны по химическому составу. Поэтому в ряде случаев неспецифическое связывание не строго линейно во всем диапазоне используемых концентраций вещества (а он весьма велик — 100—1000-кратный). Еще одним источником ошибок может быть интенсивный метаболизм вещества в ходе опыта.

Одна из основных трудностей в изучении связыва-

ния гормона или нейромедиатора с рецептором состоит в том, что концентрация рецепторов в клетке, как правило, много меньше концентрации некоторых ферментов, способных специфически связывать эти регуляторы. Поэтому часто опытам по связыванию предшествует очистка от ферментов. Гормонсвязывающие участки могут осуществлять запасание гормона в клетке, защиту его от инактивации, но не участвовать непосредственно в реализации биологического эффекта.

Для доказательства того, что та или иная структура клетки — рецептор, необходимо показать, что она не только может «узнавать» гормон и связывать его быстро, обратимо, с высоким сродством, высокоспецифично, но и непосредственно участвует в проявлении этого эффекта, является первым и необходимым компонентом в цепи

передачи гормонального сигнала на клетку. Поскольку последнее свойство, как отмечалось, проверить на разрушенных структурах клетки крайне трудно, а подчас и невозможно, прибегают к накоплению разных доказательств того, что гормонсвязывающая структура клетки отвечает всем остальным критериям рецептора. Рассмотрим эту систему доказательств.

Для того чтобы убедиться, что «специфическое» связывание происходит со специфическим участком белковой молекулы, а не представляет собой артефакт метода, необходимо проверить скорость этого связывания и его обратимость. Из данных, представленных на рис. 51, можно рассчитать константы скоростей диссоциации и ассоциации гормон-рецепторного комплекса, а по соотношению этих констант — константу сродства. Эти константы должны быть близки константе сродства, рассчитанной из прямых опытов по измерению зависимости специфического связывания от кон-

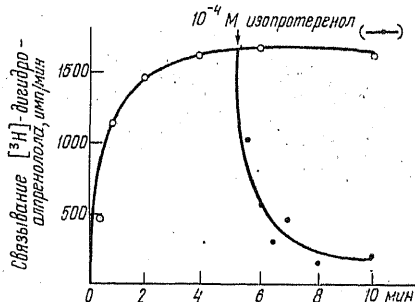


Рис. 51. Зависимость специфического связывания от времени инкубации мембран сердца кролика с 10^{-8} М дигидроалпренололом. Стрелкой указан момент добавки в инкубационную среду изопротеренола

центрации данного вещества (например, путем преобразования данных рис. 50 в координатах Скэтчарда). Если агонисты или антагонисты рецептора имеют асимметричный атом, то физиологически активные стереоизомеры должны вытеснять радиоактивный лиганд из участков специфического связывания гораздо лучше, чем малоактивные стереоизомеры (рис. 52). Очевидно также, что связывание с определенным рецептором не должно быть чувствительно к агонистам и антагонистам другого рецептора. Как видно из рис. 52, антаго-

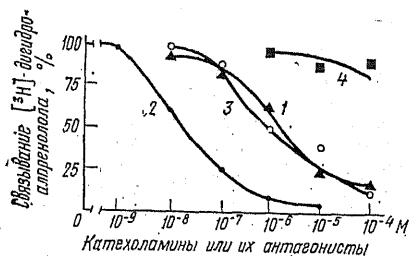


Рис. 52. Зависимость специфического связывания меченого 10^{-8} М дигидроалпренолола от концентрации немеченых агонистов и антагонистов адренергических рецепторов: 1 — D, L-изопротеренол, 2 — L-алпренол, 3 — D-алпренол, 4 — фентоламин

нист α -адренергических рецепторов фентоламин практически не влияет на связывание дигидроалпренолола, антагониста β -адренергических рецепторов.

Кинетические константы, полученные в такого рода исследованиях, не обязательно будут равны константам, полученным в физиологических экспериментах, так как между оккупацией рецептора и биологическим эффектом чаще всего не существует линейной зависимости. Однако основные закономерности связывания должны быть общими. Так, например, согласно физиологическим данным, сродство β -адренергических рецепторов к агонистам убывает в ряду: изопротеренол > адреналин > норадреналин. Такой же ряд эффективности должен быть получен и в опытах по измерению связывания этих агонистов, если «специфическое» связывание действительно отражает процесс взаимодействия с рецептором. В силу этого параллельно с опытами по связыванию на том же объекте измеряют константы для исследуемых веществ по биологическому эффекту (в случае β -адренергических рецепторов, например, активацию аденилатциклазы (рис. 53 и 54).

Связывание гормона с рецептором — регулируемый процесс. Хорошим доказательством того, что «специфи-

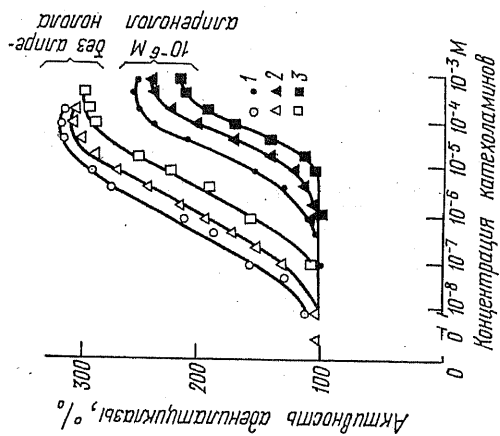


Рис. 53. Влияние алпренолола на зависимость активности аденилатциклазы сердца кролика от концентрации катехоламинов: 1 — изопроterenол, 2 — адреналин, 3 — норадреналин

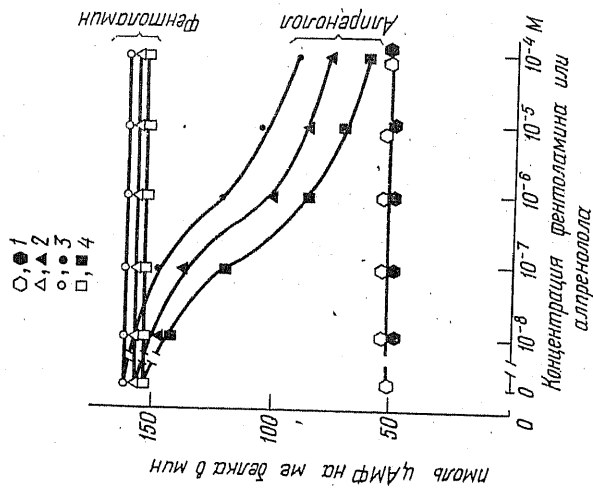


Рис. 54. Зависимость активности аденилатциклазы сердца кролика от концентрации агонистов адренергических рецепторов, измеренная в отсутствие и в присутствии катехоламинов: 1 — без гормонов, 2 — 10⁻⁴ М адреналин, 3 — 10⁻⁴ М изопроterenол, 4 — 10⁻⁴ М норадреналин

ческое» связывание осуществляется рецептором, может служить влияние на это связывание специфических регуляторов рецептора, например, уменьшение константы сродства для агониста мембранного рецептора под действием ГТФ или его негидролизуемого аналога $G_{pp}(NH)_p$ (рис. 55). Следует, однако, помнить, что регуляторы могут по-разному влиять на связывание агониста и антагониста. Так, например, ГТФ уменьшает

сродство к агонисту и не влияет на сродство к антагонисту, возможно, из-за того, что с ГТФ-связывающим белком может реаги-

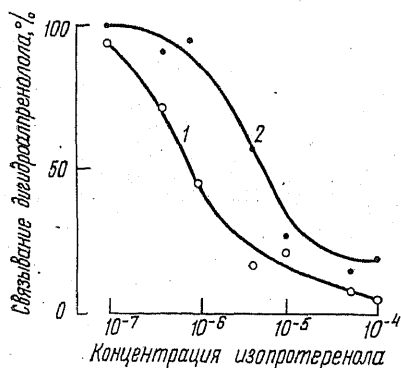


Рис. 55. Влияние $G_{pp}(NH)_p$, негидролизуемого аналога ГТФ, на зависимость специфического связывания ди-гидроалпренолола от концентрации изопротеренола: 1 — без гуаниловых нуклеотидов, 2 — в присутствии 10^{-4} М $G_{pp}(NH)_p$

ровать только «активированный» рецептор (см. раздел 4.2.1). «Благополучный» исход подобной серии экспериментов позволяет сделать вывод, что применяемый метод связывания характеризует специфические структуры клетки, отвечающие основным критериям рецептора.

Успех в опытах по измерению связывания вещества с рецептором в значительной степени определяется правильным выбором радиоактивного лиганда. Так, при использовании меченого адреналина специфическое связывание будет происходить с обоими типами рецепторов (α и β), а также с моноаминоксидазой и катехол-О-метилтрансферазой (см. раздел 2.2.4). Окисляясь, адреналин может соединяться и со многими другими белками (например, альбумином), причем в этом случае может образовываться даже ковалентная связь. Антагонисты адренергических рецепторов в аналогичных условиях не окисляются и не связываются с перечисленными ферментами. Кроме того, антагонисты из-

бирательны в отношении α - и β -рецепторов. Очевидно, что для оценки связывания адреналина с α - или β -рецептором лучше измерять вытеснение соответствующего меченого антагониста нерадиоактивным адреналином, чем прямое связывание меченого адреналина.

При выборе лиганда необходимо учитывать, сколько радиоактивного изотопа может быть включено в его молекулу без нарушения сродства к рецептору. Поскольку количество рецепторов в биологическом материале низко, а сродство к гормонам высоко, используемый лиганд должен иметь высокую удельную радиоактивность (выше 10 Ки/ммоль). Очевидно, что при использовании в качестве изотопа ^3H более подходящим лигандом является алпренолол, который имеет ненасыщенную двойную связь в участке, несущественном для связывания с рецептором, чем пропранолол, который имеет такую же избирательность в отношении β -рецепторов и такое же сродство к ним, но может включить в свою молекулу меньшее количество радиоактивной метки (см. рис. 42).

Чем выше удельная радиоактивность вещества, тем меньшую концентрацию его можно применять в опытах по связыванию (соблюдая, однако, условия, чтобы концентрация меченого вещества превышала концентрацию рецепторов, иначе стационарная кинетика Михаэлиса будет неприменима для анализа результатов). Снижение концентрации меченого лиганда приводит к уменьшению доли неспецифического связывания в общем связывании радиоактивности с биологическим материалом. Это значительно облегчает работу и уменьшает ошибку эксперимента. Другой «секрет» понижения неспецифического связывания состоит в очистке биологического материала. Так, вследствие очистки мембран эритроцитов или ретикулоцитов неспецифическое связывание алпренолола может быть снижено с 30—50 до 1—5% от общего связывания.

Наличие рецепторов в том или ином биологическом материале можно доказать иммунологически. Как правило, антитела, выработанные на определенный рецептор, вызывают те же физиологические эффекты, что и антагонисты этих рецепторов. Так, например, введение кроликам холинергического рецептора, выделенного из электрического ската или угря, приводит к образованию антител, вызывающих паралитический синдром,

т. е. действующих подобно яду кураре — известному антагонисту холинергических рецепторов. Иммунологические методы нашли широкое применение в изучении рецепторов.

Если гормон привязать ковалентно к какому-либо белку, а затем ввести в кровь животного, образуются

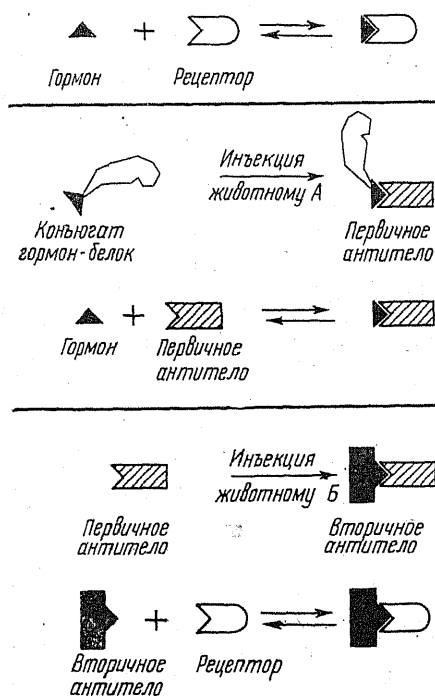


Рис. 56. Способы получения антител к гормону и рецептору

не будут обладать способностью взаимодействовать с гормоном, но будут связываться с рецептором этого гормона (см. рис. 56). Применение «вторичных» антител в качестве «аффинного» сорбента может сыграть большую роль в очистке рецепторов. В настоящее время эти антитела широко применяются в изучении локализации рецепторов. Обычно их метят флуоресцирующими агентами, наносят на срезы тканей или в суспензии клеток, а затем по локализации флуоресцирующего материала

антитела на этот конъюгат (рис. 56). Среди этих антител можно найти такие, которые имеют гормонсвязывающие домены. Интересно, что специфичность и константы связывания гормона с рецептором и такими антителами могут быть очень близкими. Таким образом, не имея достаточно чистого рецептора, можно получить «модель» этого рецептора и на ней исследовать процессы связывания гормона, а возможно, даже роль разных функциональных групп в гормонсвязывающем участке белка.

Если такие антитела ввести животному другого вида, можно получить «вторичные» антитела, которые

определяют местонахождение рецепторов. Так, в частности, была обнаружена способность мембранных рецепторов объединяться в кластеры (см. раздел 5.1). В ряде случаев «вторичные» антитела блокируют биологические эффекты соответствующего рецептора. Это свойство антител можно использовать для изучения механизма действия гормонов, которые не имеют антагонистов (практически все белковые гормоны). Возможно, эти антитела найдут применение и в медицине, так как некоторые заболевания связаны с высокой секрецией гормонов или с повышенной гормон-рецептирующей активностью ткани-мишени.

Весьма эффективным инструментом в изучении рецепторов является метод слияния разных клеток. Это достигается либо с помощью вируса Сендая, либо с помощью химических агентов (например, полиэтиленгликоля), вызывающих слияние плазматических мембран разных клеток с образованием одной клетки из нескольких.

Слияние клеток, «некомпетентных» в отношении стероидных гормонов, с клетками, имеющими рецепторы стероидов, позволяет получить «гибрид», отвечающий на стероидные гормоны синтезом новых, ранее не синтезировавшихся белков (рис. 57).

С помощью метода слияния клеток было показано, что после инактивации мембранного рецептора в одной клетке, а аденилатциклазы — в другой можно получить гибридную клетку, аденилатциклаза которой имеет чувствительность к данному рецептору. Так впервые была достигнута реконструкция гормончувствительного аденилатциклазного комплекса. С помощью вируса Сендая в мембрану, содержащую аденилатциклазу, было встроено несколько разных рецепторов из других тканей и каждый из них сообщал ферменту чувствительность к соответствующему гормону. Следовательно, одна и та же молекула аденилатциклазы может взаимодействовать с самыми разнообразными мембранными рецепторами. В настоящее время известно более 20 гормональных рецепторов, которые могут регулировать активность аденилатциклазы. Эти рецепторы, по видимому, имеют разные гормонсвязывающие участки, но общий «домен», ответственный за взаимодействие с аденилатциклазным комплексом.

Функциональная активность выделенных и очищен-

ных рецепторов продемонстрирована только для рецепторов ацетилхолина и стероидных гормонов. «Реконструкция» рецепторов стероидных гормонов обычно проводится путем инкубации с ядрами, выделенными из тех же клеток, из которых выделялись эти рецепторы,

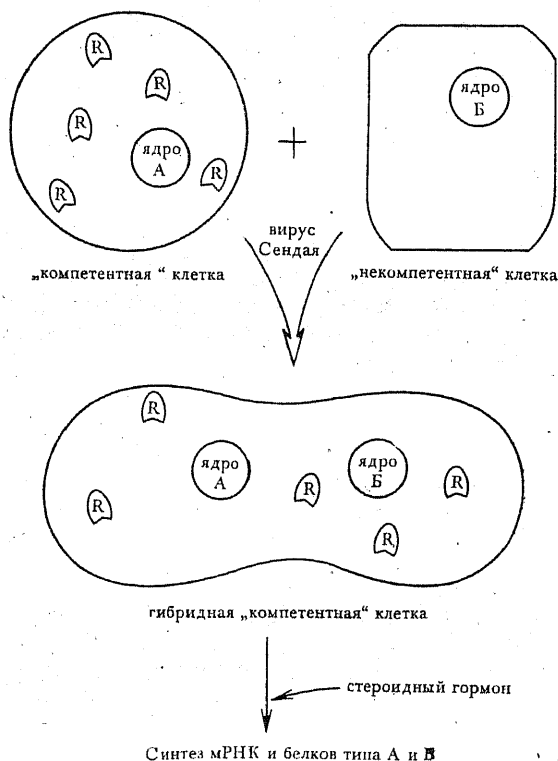


Рис. 57. Изучение рецепторов и гормональной регуляции методом слияния клеток

либо из других, в том числе и таких клеток, которые не имеют рецепторов стероидных гормонов и поэтому в физиологических условиях не чувствительны к стероидам. В обоих случаях удастся обнаружить проникновение рецепторов (в комплексе с гормонами) в ядро, увеличение количества участков связывания РНК-полимеразы на хроматине, а затем — синтез мРНК. Ти-

пы мРНК, образующиеся под действием стероидов, определяются прежде всего ядром этих клеток. Чувствительность к стероидам ядер, полученных из «некомпетентных» клеток, свидетельствует о том, что регуляция путем индукции — репрессии свойственна всем клеткам, но проявление этого механизма регуляции определяется наличием рецепторов. Следует отметить, что известны случаи, когда клетка имеет функционально активные рецепторы стероидов, однако регуляция клетки гормонами не проявляется. Это наблюдается в онтогенезе животного (рецепторы и стероидные гормоны появляются раньше, чем гормонзависимые механизмы регуляции транскрипции), а также при некоторых патологических состояниях организма.

В настоящее время в виде очищенных индивидуальных белков получены рецепторы стероидных гормонов (прогестин, глюкокортикоидов и половых гормонов) и холинергический рецептор никотинового типа. Успех в выделении холинергического рецептора в значительной степени определился удачным выбором объекта. Было обнаружено, что концентрация этих рецепторов в электрическом органе ската *Torpedo* или угря *Electrophorus* в сотни раз выше, чем во всех других исследованных тканях и объектах. В электрическом органе тысячи мембран соединены параллельно в одну «батарею», в результате чего изменение потенциала на каждой из мембран, возникающее под действием ацетилхолина и составляющее десятки милливольт, суммируется и дает на «выходе» потенциал, равный киловольту. Эти мембраны буквально насыщены холинергическими рецепторами. Из 1 кг электрического органа можно выделить сотни миллиграммов гомогенного препарата холинергического рецептора. Для получения индивидуального белка достаточна его очистка всего в сто раз.

Определенную роль в очистке холинергического рецептора сыграло также применение нейротоксинов из яда кобры. Эти полипептиды с молекулярным весом в несколько тысяч очень прочно и специфически связываются с холинергическим рецептором. Использование аффинной хроматографии на колонках с нейротоксином оказалось наиболее эффективным способом очистки рецептора. Кроме того, некоторые нейротоксины, например бунгаротоксин, связываются с холинергическим

рецептором очень избирательно и практически необратимо. После преинкубации неочищенных фракций электрического органа с бунгаротоксином, меченым ^{125}I или ^3H , можно проводить выделение, следя за рецептором по связанной с ним радиоактивности.

Гомогенный препарат холинергического рецептора представляет собой сложный олигомерный комплекс. Молекулярный вес рецептора, выделенного из электрического угря, равен 230 000—360 000. Рецептор построен из трех типов субъединиц с молекулярным весом 40 000—53 000. Молекулярный вес рецептора, выделенного из электрического ската, равен 200 000—400 000. Этот рецептор состоит из 4 типов субъединиц с молекулярными весами 40 000—65 000. Изoeлектрическая точка рецептора равна 4,5—4,8, что объясняется высоким содержанием кислых (20—25%) и низким содержанием основных (10—12%) аминокислотных остатков.

Около 5% от веса рецептора составляют углеводы. В их числе манноза, глюкоза, глюкозамин, N-ацетилглюкозамин, N-ацетилгалактозамин и, возможно, галактоза. Сахара обнаружены в составе всех субъединиц холинергического рецептора.

Другие мембранные рецепторы также, по-видимому, являются гликопротеидами. Об этом свидетельствуют данные о потере гормонсвязывающих свойств или исчезновении биологических эффектов гормонов и нейромедиаторов после обработки мембран ферментами, отщепляющими углеводные остатки от белков.

3.4.

ЗАВИСИМОСТЬ МЕЖДУ ОКУПАЦИЕЙ РЕЦЕПТОРА И БИОЛОГИЧЕСКИМ ЭФФЕКТОМ ГОРМОНА

Все рецепторы, известные в настоящее время, обнаружены по биологическим эффектам гормонов. Агонисты и антагонисты гормонов также выявляются в основном в физиологических экспериментах. Если гормон влияет на функциональную или метаболическую активность ткани (например, вызывает деполяризацию мембран или образование свободных жирных кислот), говорят о наличии в данной ткани рецепторов для этого гормона. О силе действия агонистов судят, сравнивая

их биологические эффекты с эффектом гормона; антагонисты выявляют по блокированию этих эффектов. Так, например, многие холиномиметики обнаружены путем сравнения величины деполяризации или гиперполяризации, вызываемой ацетилхолином и исследуемым веществом, а холинолитики — по способности уменьшать действие ацетилхолина на мембранный потенциал. Подобным образом была составлена и классификация адренергических агентов. При этом экспериментатор, как правило, изучает зависимость эффекта (потенциал, распад гликогена или освобождение жирных кислот) от концентрации гормона, его агонистов и антагонистов и тем самым оценивает сродство этих агентов к рецептору. Абсолютные величины констант, получаемые в такого рода экспериментах, в большинстве случаев являются кажущимися. Они могут на несколько порядков отличаться от истинных констант связывания гормона с рецептором.

Впервые попытку дать кинетическое описание всей системы проведения гормонального сигнала (от связывания с рецептором до реализации биологического эффекта) предпринял Кларк в 1926 г. Он предположил, что существует прямо пропорциональная зависимость между долей рецепторов, связавшихся с веществом, и ответом ткани на это вещество. Иными словами, при оккупации гормоном 50% рецепторов развивается полумаксимальный биологический эффект, следовательно, константа сродства, определяемая в физиологическом эксперименте, является истинной, характеризует сродство рецептора к гормону.

Вскоре, однако, было обнаружено, что максимальный биологический эффект может развиваться даже в том случае, если гормон оккупировал лишь малую долю рецепторов. Так, например, после преинкубации гладких мышц, сердца и других тканей с кураре или атропином образуется прочный комплекс между холинергическим рецептором и соответствующим антагонистом. Этот комплекс может разрушаться лишь в течение десятков минут, однако эффект ацетилхолина (причем такой же по величине, как и на непреинкубированной ткани) развивается уже спустя несколько секунд после начала отмывания рецептора от блокатора. Это противоречие с теорией Кларка можно было объяснить вытеснением блокатора ацетилхолином путем отрицательной

кооперативности. Однако выявление таких же эффектов при использовании блокаторов, которые необратимо связываются с рецептором (например, дибензамина), исключало такое объяснение. Стало ясно, что в клетке существует «избыток» рецепторов, благодаря чему гормон или его агонист может вызывать максимальный ответ даже тогда, когда он оккупирует лишь небольшую долю клеточных рецепторов.

Концентрация катехоламинов, циркулирующих в крови, равна 10^{-9} — 10^{-8} М. Сродство рецепторов к этим гормонам обычно ниже ($K_d = 10^{-7}$ — 10^{-6} М). Полумаксимальная активация аденилатциклазы в мембранных препаратах, выделенных из разных тканей, наблюдается в присутствии сравнительно высоких концентраций катехоламинов (10^{-7} — 10^{-6} М), а влияние на гликогенолиз или липолиз в тканях (эффекты, опосредуемые синтезом цАМФ) обычно происходит в присутствии низких концентраций катехоламинов (10^{-9} — 10^{-8} М). Показано, что для проявления биологического эффекта катехоламинам достаточно связывание менее, чем с 1% β -адренергических рецепторов. Существует также 100-кратный «избыток» рецепторов гистамина, не менее чем 10-кратный «избыток» рецепторов глюкогона, ангиотензина, АКТГ и многих других гормонов.

Тот факт, что оккупация гормоном небольшого количества клеточных рецепторов приводит к развитию максимального физиологического ответа ткани, объясняется высокой степенью усиления (10^5 — 10^8 раз) гормонального сигнала. Это значит, что при связывании с рецептором одной молекулы гормона в клетке может появиться (или исчезнуть) 10^5 — 10^8 молекул определенных веществ или ионов (см. главу 4). Существование «избытка» рецепторов обеспечивает клетке высокую чувствительность к внеклеточным регуляторам.

Как уже отмечалось, есть вещества, связывание которых с рецептором вызывает такой же по величине эффект, как и связывание гормона (агонисты), есть и такие, при связывании которых никогда не достигается максимальный эффект (частичные агонисты), а есть вещества, и вовсе не вызывающие биологического эффекта, но связывающиеся с рецептором (антагонисты). Следовательно, величина биологического эффекта далеко не всегда отражает меру занятости рецепторов тем или иным веществом.

Интересную попытку объяснить, почему связывание с рецептором является обязательным, но недостаточным условием для проявления эффекта, предпринял Пейтон. В противоположность «оккупационной» теории Кларка, он постулировал, что биологический эффект гормона и его агонистов определяется не концентрацией гормон-рецепторного комплекса, а скоростью, с которой происходит связывание вещества с рецептором. «Оккупационная» теория, по мнению Пейтона, правильно описывает только эффекты антагонистов. В случае действия агонистов образовавшийся комплекс с рецептором остается инертным до тех пор, пока не распадается, и один «квант» гормон-рецепторного комплекса, образовавшегося и затем распавшегося, вызывает один или несколько «квантов» биологического эффекта.

Согласно теории «скорости» Пейтона, от константы скорости распада комплекса рецептор—вещество зависит характер действия этого вещества: если K_{-1} высока — вещество является сильным агонистом, если средней величины — частичный агонист (одновременно проявляет и миметическое и литическое действие), если низка — вещество является антагонистом.

Согласно «оккупационной» теории, между скоростями диссоциации — ассоциации комплекса вещество—рецептор и характером действия этого вещества связи не существует. Характер этого действия определяется некой «внутренней активностью» вещества. Теория Пейтона с помощью таких конкретных понятий, как константы скорости ассоциации и диссоциации, объясняет, почему одно вещество активирует, а другое — блокирует рецептор. По теории «скорости», оккупация рецепторов приводит к блокированию биологического эффекта. Это положение может объяснить двухфазное влияние многих фармакологических агентов: при низких концентрациях они оказывают активирующее, а при высоких — блокирующее действие на рецептор.

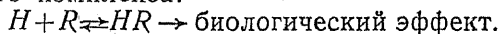
Для многих веществ показано, что их сродство к рецептору определяется константой скорости диссоциации: чем меньше K_{-1} , тем больше сродство. Антагонисты имеют, как правило, большее сродство к рецептору, что находится в полном соответствии с теорией «скорости».

К сожалению, эта теория до сих пор не подвергнута необходимому экспериментальному анализу, поэтому в

настоящее время ее приходится рассматривать только как интересную гипотезу. Отметим, что некоторые факты не укладываются в теорию «скорости». Так, например, стероидные гормоны могут влиять на процессы транскрипции, только находясь в комплексе со своими рецепторами. От момента образования такого комплекса в цитоплазме до взаимодействия с хроматином может проходить несколько минут или даже десятков минут. Отщепление гормона от рецептора лишает последний способности взаимодействовать с хроматином и тем самым проявлять биологический эффект (см. раздел 4.3).

Вернемся к теории оккупации рецепторов. Между концентрацией гормон-рецепторного комплекса и биологическим эффектом существует пропорциональная зависимость. Такая зависимость обнаружена на многих исследованных тканях со многими испытанными веществами, поэтому «оккупационная» теория, несколько изменяясь и пополняясь новыми положениями, в настоящее время лежит в основе всех биологических наук, занимающихся исследованием действия физиологически активных веществ.

Согласно этой теории, биологический эффект гормона пропорционален концентрации гормон-рецепторного комплекса:



При достижении равновесия справедливо следующее уравнение:

$$K_c = \frac{[HR]}{[H][R]} \quad \text{или} \quad [HR] = K_c [H][R].$$

Поскольку биологический эффект является функцией концентрации HR , то можно записать:

$$\text{биологический эффект} = f(K_c [H][R]).$$

Как видно из этого уравнения, биологический эффект зависит как от сродства гормона к рецептору, так и от концентрации рецепторов. Если при определенной концентрации гормона достигается определенный биологический эффект, то уменьшение сродства рецептора к гормону приведет к тому, что для достижения того же биологического эффекта понадобятся более высокие концентрации гормона. То же будет наблюдаться и при уменьшении концентрации рецепторов. Например, если рост клетки не сопровождается дополнительным синте-

зом рецепторов, то по мере роста клетка будет терять чувствительность к гормону: увеличение диаметра клетки в 2 раза приведет к увеличению площади мембраны в 4 раза, а следовательно, к 4-кратному снижению концентрации рецепторов, и тогда для активации рецепторов понадобятся более высокие концентрации гормона. Этим фактом, а не наличием изоформ рецептора может объясняться разная чувствительность различных тканей к одним и тем же гормонам.

Изменение сродства рецепторов к гормонам возможно в результате определенной модификации рецепторной молекулы. Этот путь регуляции чувствительности клетки к гормонам реализуется в природе редко. Гораздо чаще клетка реагирует на разные воздействия путем изменения концентрации рецепторов. Так, например, полнота приводит к значительному снижению концентрации рецепторов инсулина в мембранах печени, не влияя на концентрацию рецепторов гормона роста, глюкагона и катехоламинов в тех же клетках. Очевидно, что снижение концентрации рецепторов инсулина будет приводить к тем же физиологическим эффектам, что и недостаточная секреторная активность островков Лангерганса, так как для активации тканей с недостатком инсулиновых рецепторов понадобятся более высокие концентрации инсулина. Интересно, что обработка фосфолипазами мембран печени, выделенных из тучного животного, приводит к возрастанию количества инсулинсвязывающих участков в 3—4 раза, т. е. до того же уровня, что и в мембранах животного с нормальным весом.

Чувствительность клетки к стероидным гормонам может уменьшаться вследствие транслокации рецепторов в ядро, так как при этом концентрация рецепторов в цитоплазме снижается (см. раздел 4.3). Стероидные и тиреоидные гормоны могут индуцировать или подавлять синтез многих гормональных рецепторов. Например, тиреоидные гормоны влияют на концентрацию α - и β -адренергических рецепторов в сердце, а эстрогены регулируют содержание в гонадах рецепторов пролактина, лютеинизирующего и фолликулостимулирующего гормонов.

Практической медицине давно известно, что длительное применение какого-либо лекарственного вещества приводит к толерантности, т. е. к потере чувстви-

тельности организма к этому веществу. Процесс «привыкания» развивается либо за счет более интенсивного разрушения данного вещества в печени, либо за счет потери чувствительности (десенсибилизации) рецептора к веществу. В последнем случае рецепторы как бы исчезают. Достаточно на некоторое время прекратить применение этого вещества, как рецепторы вновь «появляются».

Инъекция кроликам резерпина, вызывающего «химическую денервацию» сердца, приводит почти к

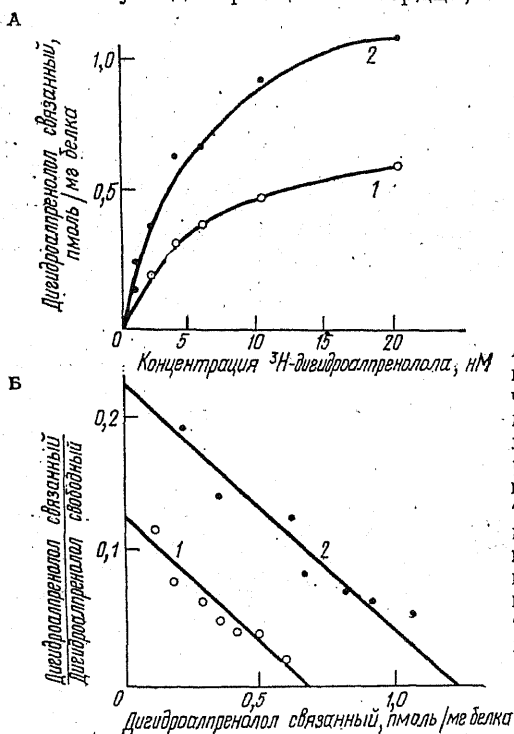


Рис. 58. Связывание алпренолола с β -адренергическими рецепторами мембран сердца кролика, выделенных из контрольных животных (линия 1) и животных, которым в течение суток до выделения были сделаны две инъекции резерпина (линия 2). А — прямые координаты, Б — те же данные, выраженные на графике Скэтчарда

2-кратному увеличению количества β -адренергических рецепторов в мембранах миокарда (рис. 58). Такой же эффект оказывают и продолжительные (в течение 2—3 недель) инъекции пропранолола — блокатора β -адренергических рецепторов. Параллельно с увеличением количества рецепторов возрастает и реактивность системы, в данном случае — степень активации аденилатциклазы миокарда катехоламинами (рис. 59).

Эти данные свидетельствуют о том, что даже при обычных условиях функционирования ткани ее β -адренергические рецепторы и аденилатциклаза частично десенсибилизированы. Устранение гормонального влияния с помощью резерпина или пропранолола приводит к ресенсибилизации ткани.

Продолжительное повышение концентрации катехоламинов в организме животного приводит к дальнейшему снижению количества β -адренергических рецепторов и практически полной потере чувствительности аденилатциклазы к активирующему действию этих гормонов. Подобные эффекты развиваются и на других рецепторах при длительном применении их агонистов. Так, например, ростовой гормон в концентрации 10^{-10} — 10^{-9} М за 6 ч инкубации с лимфоцитами снижает в их мембранах количество соответствующих рецепторов на 30—70%. Этот процесс обратим: удаление гормона приводит к восстановлению (за 6—24 ч) количества рецепторов до исходного уровня. Показано, что денервация скелетных мышц вызывает увеличение количества холинергических рецепторов, а длительное действие ацетилхолина приводит к снижению количества этих рецепторов в мембранах. Продолжительное действие прогестерона, который, как и все стероиды, связывается не с мембранными, а с внутриклеточными рецепторами, также вызывает снижение количества этих рецепторов в клетке.

Интересным исключением из общего правила является пролактин. При длительном действии этого гормона в молочной железе не снижается, а возрастает количество рецепторов пролактина.

Что происходит с рецептором при длительном воз-

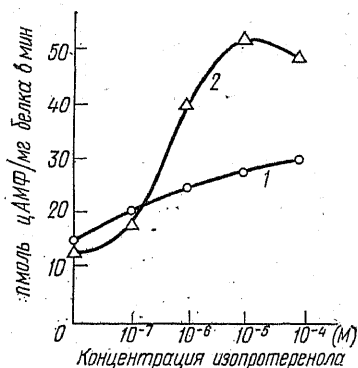


Рис. 59. Зависимость активности аденилатциклазы от концентрации изопротеренола, измеренная на мембранных препаратах сердца контрольных крыс (линия 1) и крыс, которым в течение трех недель ежедневно делали инъекции пропранолола (линия 2)

действию на него гормона или нейромедиатора? По-видимому, рецепторы не исчезают, не инактивируются — они «маскируются». Те рецепторы, которые перестали связывать гормон и функционировать вследствие длительного воздействия на них гормона, удается выявить и сделать функционально активными, например, путем преинкубации очищенной фракции мембран с агентами, снижающими средство рецепторов к гормону (рис. 60).

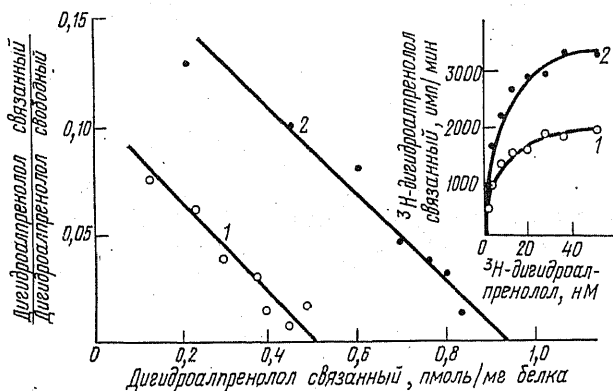


Рис. 60. Связывание алпренолола с β -адренергическими рецепторами мембранного препарата сердца кролика. Преинкубация мембран при 37°C в течение 20 мин в буферном растворе (линия 1) не влияла на связывание, а такая же преинкубация в присутствии алпренолола и ГТФ (линия 2) приводила к увеличению количества алпренололсвязывающих участков в мембране и не изменяла средства этих участков к меченому алпренололу

В этом случае очищенные мембраны инкубируются в среде, не содержащей белоксинтезирующей системы (рибосом, нуклеотидов, аминокислот), поэтому повышение количества рецепторов нельзя объяснить их дополнительным синтезом.

На многих тканях показано, что десенсбилизация рецепторов — это не разрушение, не инактивация гормонсвязывающих белков, а восстановление чувствительности — это не синтез белка *de novo*. При длительном воздействии гормонов и нейромедиаторов рецепторы переходят в латентное состояние. Устранение гормона из организма или же применение антагониста приводит к «демаскировке» соответствующих рецепторов.

Существование в клетке «избытка» рецепторов ни в

коей мере не умаляет важности механизмов регуляции концентрации рецепторов. Если физиологический ответ достигается при связывании вещества с 1% рецепторов, то при увеличении концентрации гормонсвязывающих участков в 2 раза он будет достигаться при оккупации 0,5% рецепторов, вследствие чего чувствительность клетки к данному веществу возрастет в 2 раза.

Многие клетки асимметричны либо морфологически,

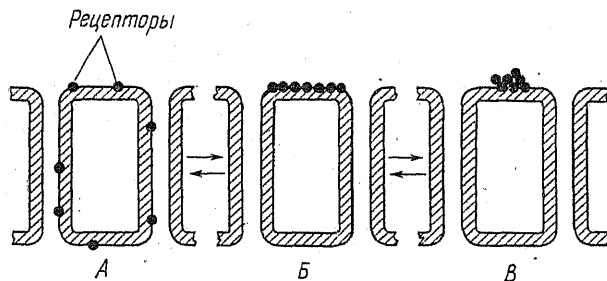


Рис. 61. Три состояния мембранных рецепторов: А — равномерное распределение в липидном бислое мембраны, Б — образование «заплат», В — образование «шапок». Объяснение см. в тексте

либо в отношении поступления на их поверхность питательных веществ и регуляторных воздействий. Как следует из приведенных выше уравнений (см. с. 148), биологический эффект пропорционален концентрации, а не общему числу рецепторных молекул. Поэтому концентрирование рецепторов в определенном участке клетки может оказывать тот же эффект (увеличение чувствительности клетки к гормону), что и общее увеличение количества рецепторных молекул в клетке.

Один из важных механизмов регуляции чувствительности к гормону — образование в цитоплазматической мембране рецепторных кластеров, которые, в зависимости от их формы, носят название «заплаты» или «шапки» (рис. 61). Предполагается, что такое концентрирование рецепторов в определенном участке мембраны может происходить за счет неоднородного распределения липидов в мембране, т. е. за счет существования в мембране липидных ареалов с разной вязкостью. Более определенно известно об участии в этом процессе микротрубочек и микрофиламентов (см. раздел 1.2), которые словно якоря, держат мембранные белки в

определенных участках мембраны. Разрушение микро-
трубочек или микрофиламентов с помощью фармаколо-
гических агентов приводит к исчезновению рецепторных
кластеров и равномерному распределению молекул бел-
ка по всей поверхности липидного бислоя. Очевидно,
что если клетка сумеет сконцентрировать все мембран-
ные рецепторы на площади, равной 1% всей площади
мембраны, и если именно на этот участок мембраны
направлено действие регулятора, то чувствительность
клетки к регулятору возрастает в десятки раз. Наибо-
лее выраженным способом такой регуляции является
синапс — специальное морфологическое образование,
в котором нейромедиатор секретируется из участков
пресинаптической мембраны, расположенных против
рецепторов, сконцентрированных на малом участке
постсинаптической мембраны.

Концентрирование рецепторов, не закрепленное спе-
циальной морфологической структурой, хорошо наблю-
дается в лимфоцитах и асимметричных клетках слизи-
стой. В этих клетках рецепторы сравнительно быстро
(за несколько минут) могут собираться в кластеры в
самых разных участках мембраны, а затем распадаться
(см. рис. 61), тем самым осуществляя быстрый и об-
ратимый контроль за чувствительностью клетки к со-
ответствующему регулятору.

Существуют способы изменения концентрации ре-
цепторов в клетке, связанные с необратимой инак-
тивацией рецепторных молекул. При продолжительном
действии высоких концентраций регулятора может про-
исходить образование рецепторных «шапок», в которых
молекулы рецепторов соединены между собой кова-
лентными связями. По мнению Пастана, это происходит
за счет образования пептидных связей (при участии
трансглутаминазы) между свободными карбоксильными
группами одного белка и свободными аминогруппами
другого. После завершения сшивок происходит впячи-
вание той части мембраны, которая несет на себе «шап-
ку», отшнуровывание ее от цитоплазматической мемб-
раны и появление в цитоплазме «рецепторосом». Раз-
меры этих образований достаточно значительны —
150—300 нм. Вскоре после появления в цитоплазме ре-
цепторосомы сливаются с лизосомами, и рецепторы рас-
щепляются протеазами (рис. 62). Таким способом ко-
личество рецепторов в клетке может снижаться в

3—5 раз. Очевидно, что после этого процесса восстановление чувствительности клетки к регулятору потребует значительного времени — должен произойти синтез новых молекул и их встраивание в мембрану.

На уровне образования комплекса между веществом и рецептором природа создала достаточно разнообразные механизмы регуляции чувствительности клетки к гормону. Одним из них является способ изменения концентрации рецепторов, другим — изменение константы сродства рецептора к гормону.

Связывание инсулина весьма чувствительно к водородному показателю среды. При изменении pH внеклеточной жидкости от 7,4 до 7,0 (это реальное закисление, происходящее при голодании или диабете вследствие образования кетоновых тел — ацетоацетата и оксибутирата) связывание инсулина с рецептором снижается на 50%. На примере инсулиновых рецепторов мы рассматривали явление отрицательной кооперативности (см. раздел 3.2). Когда гормонсвязывающие участки «пустые», они все имеют высокое сродство к гормону, когда «оккупированные» — их сродство к гормону низкое (см. рис. 47). Этот способ регуляции также реализуется через изменение константы сродства.

При некоторых патологических состояниях организма могут образовываться аутоантитела, которые, связываясь с рецепторами, изменяют их сродство к гормонам. Типичным примером является взаимодействие ан-

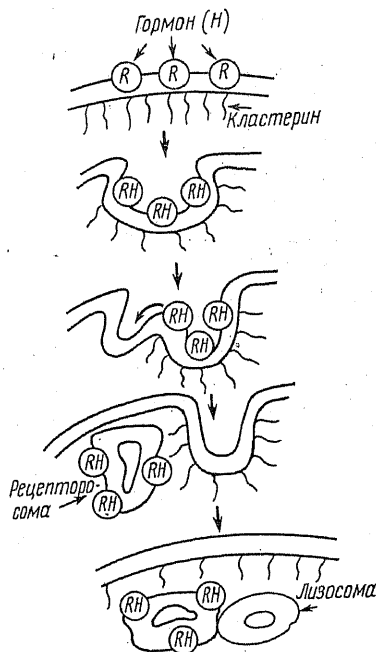


Рис. 62. Один из способов снижения концентрации рецепторов в мембране, связанный с их перемещением во внутриклеточное пространство и последующим разрушением. Объяснение см. в тексте

тител, образующихся при одной из форм миастении, с холинергическими рецепторами в нервно-мышечном синапсе.

Сродство мембранных рецепторов к гормону регулируется также с помощью специального мембранного белка. В последнее время на многочисленных объектах показано, что функционирование практически всех мембранных рецепторов (не только гормональных, но и рецепторов, определяющих иммунную реактивность клеток) зависит от гуаниловых нуклеотидов. В плазматических мембранах всех исследованных клеток найден ГТФ-связывающий белок (*N*-белок), который можно рассматривать как сопрягающий фактор, осуществляющий передачу сигнала с рецептора, «активированного» гормоном, на другие структуры клетки. Наиболее хорошо изучена роль ГТФ-связывающего белка в процессах активации аденилатциклазы гормонами (см. раздел 4.2.1). ГТФ-связывающий белок не только участвует в проведении гормонального сигнала, но и влияет на его формирование — на реакцию связывания гормона с рецептором.

Предполагается, что рецепторы, сопрягающий фактор и другие мембранные белки, участвующие в передаче сигнала через мембрану (например, аденилатциклаза) способны к независимому латеральному движению в бислой. Встречи этих белков могут быть эффективными только в том случае, если с белком связаны соответствующие кофакторы (с рецептором — гормон, с сопрягающим фактором — ГТФ или ГДФ). В этом случае образуется функционально активный комплекс рецептора с сопрягающим белком, а затем сопрягающего белка с аденилатциклазой (см. рис. 17), в результате чего сигнал с рецептора передается на фермент.

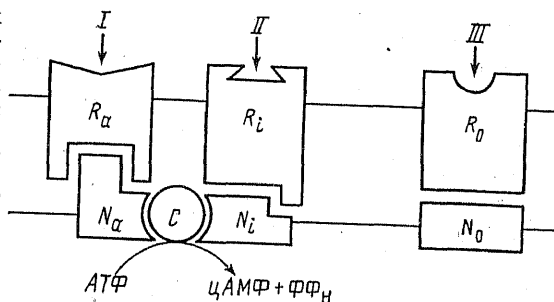
Существует другая точка зрения: кофакторы не обязательны для образования белок-белковых комплексов, однако они увеличивают у белков сродство друг к другу, в результате чего возрастает количество функционально активных комплексов. Рецептор может находиться как в свободном состоянии, так и в комплексе с ГТФ-связывающим белком.

Связывание рецептора с сопрягающим фактором происходит в том случае, если рецептор активирован гормоном или его агонистом. Образование белок-белко-

вого комплекса приводит к значительному повышению сродства рецептора к гормону. Благодаря образованию комплекса становится возможным связывание ГТФ с сопрягающим фактором. После присоединения ГТФ резко (в 5—50 раз) уменьшается сродство рецептора к гормону.

Помимо ГТФ-связывающего белка, активирующего аденилатциклазу, в мембранах есть ГТФ-связывающие белки, оказывающие на фермент ингибирующее влия-

Рис. 63. Способы действия на клетку агентов, имеющих мембранные рецепторы. R_α , R_i и R_0 — рецепторы, которые соответственно активируют и ингибируют аденилатциклазу или действуют независимо от аденилатциклазы. N_α , N_i и N_0 — соответствующие ГТФ-связывающие белки, C — каталитическая субъединица аденилатциклазы. I — агенты, активирующие аденилатциклазу (β -адренергические, гормоны белковой природы); II — агенты, ингибирующие аденилатциклазу (α_2 -адренергические, опиаты, холинергические — мускариновой природы); III — агенты, не влияющие на аденилатциклазу (α_1 -адренергические, ангиотензин)



ние (рис. 63). Так, например, эндорфины, энкефалины, катехоламины (в случае действия через α_2 -адренергические рецепторы) и холинергические агенты мускариновой природы могут ингибировать аденилатциклазу, и это ингибирование является ГТФ-зависимым процессом.

В мембранах существуют также ГТФ-связывающие белки, которые функционируют независимо от аденилатциклазы, но участвуют в работе мембранных рецепторов (см. рис. 63). В качестве примера можно привести влияние ангиотензина на мозговой слой надпочечников, инсулина и α_1 -адренергических рецепторов на клетки печени и мышечные волокна.

По-видимому, связь рецепторов с определенным типом ГТФ-связывающих белков не predetermined. Во всяком случае, катехоламины, действуя через α -ад-

ренергические рецепторы, в одних тканях могут активировать аденилатциклазу, в других — ингибировать ее, в третьих — влиять на функциональную активность независимо от цАМФ. Возможно, ГТФ-связывающий сопрягающий фактор является тем самым «стрелочником», который определяет, по какому пути направить гормональный сигнал в клетке.

Правомерен вопрос и о том, различны ли по своей молекулярной природе те ГТФ-связывающие белки, которые оказывают столь разное влияние на функции клетки. По крайней мере один из идентифицированных к настоящему времени ГТФ-связывающих белков (оказывающей активирующее влияние на аденилатциклазу) может существовать в мембране в разных структурно-функциональных состояниях: он может быть ГТФазой и может быть лишен каталитической активности (с помощью специального внутриклеточного механизма), содержать в нуклеотидсвязывающем центре как ГТФ, так и ГДФ, совершать переходы из агрегированного в дезагрегированное состояние. Поэтому нельзя исключить, что один и тот же ГТФ-связывающий белок в зависимости от своего структурно-функционального состояния направляет гормональный сигнал либо по пути, независимо от циклических нуклеотидов, либо по пути активации или ингибирования аденилатциклазы.

Благодаря функциональному сопряжению с ГТФ-связывающим белком, мембранный рецептор может иметь разные константы сродства к гормону: среднюю (свободный рецептор), высокую (рецептор в комплексе с нуклеотидсвязывающим белком), низкую (после присоединения к комплексу ГТФ). ГТФазная активность сопрягающего фактора регулируется рядом внутриклеточных белков и кофакторов (см. раздел 4.2.1), благодаря чему ГТФ-зависимое изменение константы сродства мембранного рецептора к гормону находится под контролем процессов, протекающих в клетке.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Взаимодействие гормонов с рецепторами / Под ред. Дж. Леви. М., Мир, 1979.
Михельсон М. Я., Зеймаль Э. В. Ацетилхолин. Л., Наука, 1970.

Boeynaems J. M., Dumont J. E. Quantitative analysis of the binding of ligands to their receptors. — *J. of Cyclic Nucl. Res.*, 1975, vol. 1, p. 123—142.

Berthelsen S., Pettinger W. A. A functional basis for classification of α -adrenergic receptors. — *Life Sciences*, 1977, vol. 21, p. 595—606.

Catt K. J., Dufau M.-L. Peptide hormone receptors. — *Ann. Rev. Physiol.*, 1977, vol. 39, p. 529—557.

Cell membrane receptors for viruses, antigens and antibodies, polypeptide hormones, and small molecules / Eds. R. F. Beers, E. G. Bassett. New York, 1979.

Cellular receptors for hormones and neurotransmitters / Eds. D. Schulster, A. Levitzki. New York, 1980.

Clark A. J. The reaction between acetylcholine and muscle cells. The antagonism of acetylcholine by atropine. — *J. Physiol. (Gr. Brit.)*, 1926, vol. 61, N 1, p. 530—556.

Cuatrecasas P., Hollenberg M. D. Membrane receptors and hormone action. — *Adv. in protein chemistry*, 1976, vol. 31, p. 251—451.

De Lean A., Munson P. J., Rodbard D. Multi-subsite receptors for multivalent ligands. Application to drugs, hormones, and neurotransmitters. — *Mol. Pharmacol.*, 1979, vol. 15, p. 60—70.

Haber E., Wrenn S. Problems in identification of the beta-adrenergic receptors. — *Physiol. Rev.*, 1976, vol. 56, N 2, p. 317—338.

Levitzki A. Catecholamine receptors. — *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 1978, vol. 82, N 1, p. 1—26.

Membrane structure and function / Ed. E. E. Bittar. New York, 1981, vol. 3.

Methods in molecular biology. Methods in receptor research / Ed. M. Blecher. New York, 1979, vol. 9.

Paton W. D. M., Rang H. P. The uptake of atropine and related drugs by intestinal smooth muscle of the guinea pig in relation to acetylcholine receptors. — *Proc. Roy. Soc., Ser. B*, 1965, vol. 163, N 1, p. 1—149.

Receptors and recognition / Eds. P. Cuatrecasas, M. F. Greaves. New York, 1981.

Receptors and human diseases / Eds. A. G. Bearn, P. W. Choppin. New York, 1979.

Rodbard D. Agonist versus antagonist. — *Trends in Pharmacol. Sci.*, 1980, vol. 1, N 9, p. 222—225.

Taylor S. I. Binding of hormones to receptors. An alternative explanation of nonlinear Scatchard plots. — *Biochemistry*, 1975, vol. 14, N 11, p. 2357—2361.

ГЛАВА 4

ПРОВЕДЕНИЕ И УСИЛЕНИЕ ГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛА

Подавляющее большинство биологически активных веществ (гормонов, нейромедиаторов, ядов, токсинов, лекарственных препаратов или любых других агентов) действует на функциональную или метаболическую активность клеток по одному из трех путей: 1) изменение компартментализации веществ в клетке или в клеточном ансамбле; 2) усиление или ослабление каталитической активности ферментов, что достигается чаще всего их модификацией; 3) изменение концентрации ферментов в клетке путем воздействия на их синтез или деградацию (см. главу 1). Первый механизм регуляции осуществляется главным образом путем изменения проницаемости биологических мембран для ионов, коферментов или метаболитов. Потенциал действия, возникающий под влиянием ацетилхолина или катехоламинов (при связывании с α -адренергическими рецепторами), вызывается входом Ca^{2+} и Na^{+} и последующим выходом K^{+} из клетки. Поступление Ca^{2+} в клетку стимулируют также ангиотензин и простагландины группы *F*, а проницаемость мембран почек для Na^{+} и воды находится под контролем альдостерона и антидиуретического гормона. Транспорт в клетку сахаров и аминокислот усиливают инсулин и соматомедины.

Изменяя концентрацию циклических нуклеотидов (цАМФ или цГМФ) в клетке, многие гормоны гипоталамуса и гипофиза (либерины, статины, тропины), а также глюкагон, простагландины группы *E* и катехоламины (при связывании с β -адренергическими рецепторами) могут влиять на реакции фосфорилирования внутриклеточных белков, в результате чего изменяется функциональная и метаболическая активность клеток.

Стероидные и тиреоидные гормоны действуют преимущественно на индукцию и репрессию синтеза белков, благодаря чему они контролируют процессы роста,

развития и дифференцировки тканей. Действуя в основном через определенный регуляторный механизм, биологически активное вещество может (прямо или опосредованно) использовать и другие способы регуляции. Так, например, наиболее важным эффектом инсулина является ускорение транспорта глюкозы в клетку. Однако инсулин может ускорять также общий белковый синтез, активируя процессы трансляции. В то же время, инсулин — репрессор синтеза ферментов глюконеогенеза в печени. Препятствуя активации аденилатциклазы другими гормонами, инсулин может понижать концентрацию цАМФ в клетке, замедляя тем самым процессы цАМФ-зависимого фосфорилирования белков. В свою очередь, гормоны, действующие путем повышения концентрации цАМФ в клетке, могут влиять не только на каталитическую активность ферментов, но и на компартментализацию веществ и на индукцию—реессию синтеза белка, так как цАМФ может изменять проницаемость мембран или скорость транскрипции. Последние эффекты данных гормонов — «вторичные», так как реализуются в основном путем цАМФ-зависимого фосфорилирования белков мембраны или хроматина.

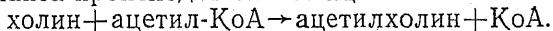
Рассмотрим основные механизмы, посредством которых биологически активные вещества действуют на клетку.

4.1.

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОНИЦАЕМОСТИ МЕМБРАН ПОД ДЕЙСТВИЕМ НЕЙРОМЕДИАТОРОВ И ГОРМОНОВ

Нейромедиаторы могут осуществлять как возбуждающее (ацетилхолин, норадреналин, гистамин, глутамат и др.), так и тормозящее влияние (γ -аминомасляная кислота, глицин, некоторые олигопептиды и др.) на постсинаптическую мембрану. Рассмотрим возбуждающее действие на примере холинергического нервно-мышечного синапса (рис. 64), а тормозящее — на примере синапсов клеток спинного мозга, медиатором которых является глицин.

В пресинаптических структурах нервно-мышечного синапса происходит синтез ацетилхолина:



Ацетилхолин накапливается в пресинаптических везикулах. В каждой везикуле содержится 2—4 тыс. молекул ацетилхолина, а также везикулин (кислый белок с молекулярным весом 10 000) и около 1000 молекул АТФ. При выделении в синаптическую щель содержимого одной везикулы открывается $2 \cdot 10^3$ каналов пассивного входа Na^+ в мышцу. Время жизни каждого из

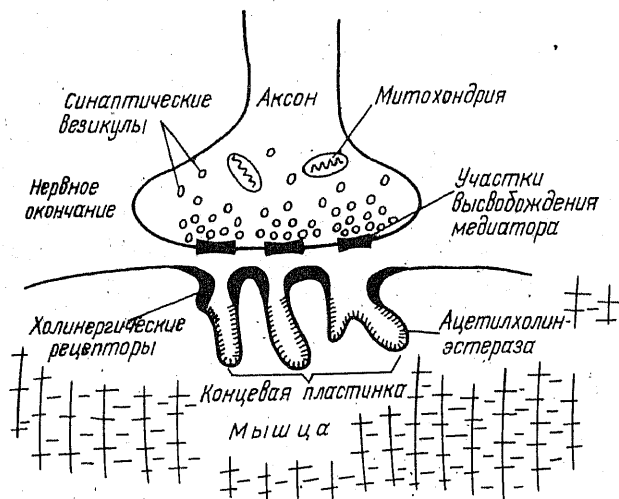


Рис. 64. Структура холинергического синапса между нервной клеткой и волокном скелетной мышцы

каналов — доли миллисекунды. За это время через один канал может перенестись несколько тысяч ионов Na^+ . Считается, что одна молекула ацетилхолина открывает один канал. Следовательно, на этом этапе передачи сигнала достигается его 1000-кратное усиление.

Потенциал на мембране покоящегося мышечного волокна равен -70 мВ (отрицательный заряд на внутренней стороне). Этот потенциал называют потенциалом покоя. Один «квант» ацетилхолина (содержимое одного пузырька) снижает потенциал покоя всего на $0,5$ мВ. Столь малые изменения заряда не приводят к возбуждению мембраны. Для того чтобы на мембране возник потенциал действия, необходимо снизить заряд до пороговой величины (-50 мВ). При снижении заряда до пороговой величины открываются так называе-

мые «потенциалзависимые» каналы (см. раздел 1.2), которые способны пропускать за 1 мс 10^5 ионов Na^+ и 300 ионов Ca^{2+} (в расчете на один канал). Вследствие этого проводимость для Na^+ возрастает в 100 раз и происходит перезарядка мембраны до +30 мВ (см. рис. 13). При перезарядке мембраны стимулируется выход K^+ из клетки (см. раздел 1.2), что приводит к восстановлению потенциала до исходного уровня.

Потенциал действия длится около 1 мс. В восстановлении заряда мембраны и ионных градиентов принимают участие Na^+ -насос и Ca^{2+} -насос плазматических мембран, а также $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмен (при входе в клетку 3 ионов Na^+ из нее выбрасывается 1 ион Ca^{2+}).

Итак, для того чтобы возбудить мышечное волокно, необходимо снизить потенциал покоя с —70 до —50 мВ. Дальнейшее снижение заряда и перезарядка происходят «самопроизвольно» за счет открывания потенциалзависимых каналов. Снижение потенциала покоя до пороговой величины происходит на постсинаптической мембране при выбросе в синапс больших количеств ацетилхолина.

Когда возбуждающий импульс, идущий по аксону, достигает нервного окончания, он вызывает разрыв 200—300 везикул, содержащих ацетилхолин. В течение 0,3 мс в синаптическую щель выбрасывается $(3-5) \cdot 10^6$ молекул ацетилхолина, его концентрация в синапсе достигает 10^{-3} М. Связываясь с рецепторами постсинаптической мембраны, ацетилхолин открывает $\sim 6 \cdot 10^5$ каналов, и при этом переносится $\sim 6 \cdot 10^8$ ионов Na^+ через постсинаптическую мембрану. Перенос таких количеств катиона достаточен для снижения потенциала до пороговой величины (—50 мВ), вследствие чего возникает, а затем распространяется по всему мышечному волокну потенциал действия.

От места секреции до места рецепции ацетилхолин проходит путь в 20—30 нм (ширина синаптической щели). Быстрота реакции на ацетилхолин определяется также тем, что на постсинаптической мембране рецепторы сконцентрированы (их плотность составляет 10^4-10^5 молекул на 1 мкм^2).

Чрезвычайно важную роль в синаптической передаче играет также ацетилхолинэстераза, которая расщепляет ацетилхолин до холина и ацетата. Концентрация этого фермента на постсинаптической мембране (см.

рис. 64). такая же, как и концентрация холинергических рецепторов. Быстро разрушая ацетилхолин, ацетилхолинэстераза подготавливает синапс к восприятию следующего сигнала. Длительность потенциала действия — 1 мс. Спустя еще 1 мс синаптическая щель полностью освобождается от ацетилхолина и переходит в состояние готовности к восприятию и проведению следующего импульса. Максимальная частота синаптической передачи — 500 импульсов в 1 с. При большей частоте стимуляции синапс не успевает «восстанавливаться», импульсы начинают суммироваться, мышечное волокно переходит в состояние тетануса.

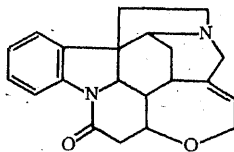
Ацетат и холин, которые образуются в синаптической щели за счет функционирования ацетилхолинэстеразы, активно транспортируются через пресинаптическую мембрану внутрь нервного окончания (система «обратного захвата», подобная той, которая удаляет из адренергического синапса катехоламины, см. раздел 2.2.4). В аксоплазме ацетат вновь образует связь с КоА за счет следующих реакций:

ацетат + АТФ → ацетил-аденилат + $\Phi\Phi_n$,

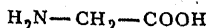
ацетил-аденилат + КоА → ацетил-КоА + АМФ, а затем активированный ацетат вновь взаимодействует с холином и образуется ацетилхолин. Везикулы, которые секретируют ацетилхолин, также возвращаются в аксон (путем пиноцитоза) и заполняются вновь синтезируемым ацетилхолином.

В так называемых «тормозных» синапсах функционируют нейромедиаторы, которые вызывают не деполяризацию (снижение потенциала покоя до пороговой величины), а гиперполяризацию (повышение потенциала покоя, его удаление от пороговой величины). Если такой нейромедиатор воздействовал на клетку, то становится труднее возбудить эту клетку (например, ацетилхолином или катехоламинами), так как после этого для возбуждения потенциала действия нужно снизить потенциал покоя, например, не на 20, а на 25—30 мВ.

Типичным тормозным нейромедиатором является глицин. Эта аминокислота, выделяющаяся в специальных синапсах, вызывает гиперполяризацию спинальных мотонейронов путем повышения проводимости мембран для ионов Cl^- . С функционированием глициновых синапсов связано и действие известного конвульсанта стрихнина, который связывается с рецепторами глицина



стрихнин



глицин

на постсинаптической мембране и препятствует гиперполяризующему действию глицина. В результате этого потенциал покоя снижается и повышается возбудимость: слабые стимулы, которые в отсутствие стрихнина являются подпороговыми, вызывают возбуждение клеток ствола мозга и спинного мозга, вследствие чего начинаются судороги.

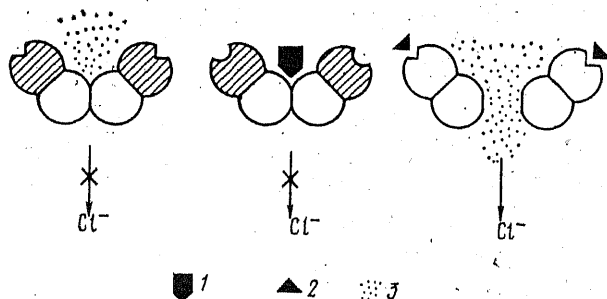


Рис. 65. Участие рецепторов глицина в регуляции проницаемости мембран для ионов хлора: 1 — стрихнин, 2 — глицин, 3 — ионы хлора

Связывание стрихнина ($K_d = 4 \cdot 10^{-9}$ М) подавляется глицином, однако при этом не происходит конкуренции за одно и то же место связывания. И стрихнин и глицин связываются некооперативно, но оказывают отрицательное влияние на связывание друг друга. Ионы хлора также кооперативно подавляют связывание стрихнина. На основании этих данных предполагается, что рецептор глицина состоит из нескольких субъединиц (рис. 65). Стрихнин связывается с участками, отличными от участков связывания глицина и ионов Cl^- , возможно, с каналом для Cl^- . При связывании стрихнина

развивается кооперативный эффект, препятствующий связыванию глицина и открыванию каналов для Cl^- . Таким образом, стрихнин — не типичный антагонист глицина (что и трудно представить, исходя из существенно разной структуры этих двух веществ). Антагонизм между глицином и стрихнином проявляется на уровне рецепции и проведения сигнала (открывание каналов), но реализуется через два разных участка связывания, между которыми существует отрицательное кооперативное взаимодействие.

Самым загадочным во всей последовательности рассматриваемых событий является вопрос о «каналах», переносящих ионы через мембрану. Рассмотрим некоторые из существующих гипотез. По современным представлениям, биологическая мембрана представляет собой мозаичную белок-липидную структуру. В некоторых участках липидный бислой прерывается белками, насквозь пронизывающими всю мембрану. В иных участках белками занят только один (наружный или внутренний) слой липида. Есть участки бислоя, полностью лишенные белков. Считается, что около 30—40% мембранных липидов связано с белками, а остальные молекулы находятся в свободном состоянии. И белки и липиды биологической мембраны могут совершать латеральное движение в плоскости мембраны, тем самым постоянно изменяя мозаичную картину. Предполагается, что «каналами» для ионов служат подвижные молекулы воды в неупорядоченной области липидов. Открывание этих «каналов» при деполяризации мембраны или при взаимодействии нейромедиатора с рецептором объясняют переходом мембранных белков в более глобулярную структуру, вследствие чего липиды и вода теряют свою упорядоченность, нарушаются гидрофобные связи с белком и появляются подвижные молекулы воды в липидном бислое. С помощью такой гипотезы очень трудно объяснить высокую селективность «каналов», их избирательность и в отношении ионов, и в отношении блокаторов.

Существует гипотеза, согласно которой роль «каналов» выполняют внутримембранные ионофоры. Как отмечалось в разделе 1.2, многие ионофоры, выделенные из микроорганизмов, обладают высокой избирательностью в отношении катионов. Связывая катион и окружая его гидрофобной «шубой», они в тысячи раз повы-

шают скорость прохождения электролита через липидный барьер. Роль ионофора, переносящего через мембрану Ca^{2+} , могут выполнять фосфоинозитиды. Ферментативное и обратимое превращение монофосфоинозитида в ди- и трифосфоинозитид сопровождается существенным изменением константы связывания липида с Ca^{2+} . Показано влияние ацетилхолина на распад и синтез этого фосфолипида, из чего возникло предположение, что в состоянии покоя (в отсутствие ацетилхолина) с холинергическим рецептором связан фосфоинозитид. Связывая ацетилхолин, рецептор, возможно, теряет сродство к этому фосфолипиду, в результате чего он отщепляется от белка и начинает функционировать как ионофор. Слабой стороной этой гипотезы является недостаточная избирательность связывания двухвалентных катионов с фосфоинозитидами.

Вопрос о метаболизме фосфоинозитидов в биологической мембране уже долгие годы занимает биологов и химиков. Достаточно сказать, что, по данным Раппопорта, около 60% всей энергии, производимой эритроцитом, затрачивается на этот процесс. На обмен фосфоинозитидов влияют мускариновые (но не никотиновые) холинергические рецепторы, α -адренергические рецепторы, рецепторы гистамина (H_1 -тип), серотонина, панкреозимина и др. Ни ионофоры для Ca^{2+} , ни блокаторы Са-каналов не затрагивают обмена фосфоинозитидов. Эффекты нейромедиаторов на метаболизм фосфоинозитидов одинаково хорошо проявляются как в отсутствие, так и в присутствии ионов Ca^{2+} . В то же время, параллельно с изменением обмена фосфоинозитидов, перечисленные рецепторы вызывают повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме.

Предполагается, что биологические эффекты нейромедиаторов и гормонов, действующих через эти рецепторы, осуществляются следующим образом. При связывании агониста с рецептором активируется некий мембранный фермент (возможно, участвующий в обмене фосфоинозитидов), который катализирует реакцию, приводящую к освобождению связанного с мембраной Ca^{2+} , а также к открыванию Са-каналов. В результате этих двух процессов повышается внутриклеточная концентрация ионов Ca^{2+} . Активируя гуанилатциклазу (см. раздел 4.2.1), Ca^{2+} приводит к повышению в клетке концентрации цГМФ, а также вызывает следующие про-

цессы (в зависимости от типа ткани): сокращение, секрецию, активацию внутриклеточных ферментов (киназа фосфорилазы, некоторые протеинкиназы, фосфодиэстераза и др.), эмиссию света, агрегацию и адгезию клеток, стабилизацию и слияние мембран, активацию митохондриальных процессов (транспорт α -кетоглутарата и адениловых нуклеотидов), деполимеризацию микротрубочек, активацию системы свертывания крови, стимуляцию синтеза ДНК, регуляцию как химической, так и электрической возбудимости мембран, фоторецепцию и т. д.

Другие рецепторы могут также влиять на концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме. Есть свидетельства того, что холинергический рецептор никотинового типа содержит Ca^{2+} . Присоединение ацетилхолина вызывает диссоциацию Ca^{2+} от рецептора, в результате чего Ca^{2+} перемещается в цитоплазму.

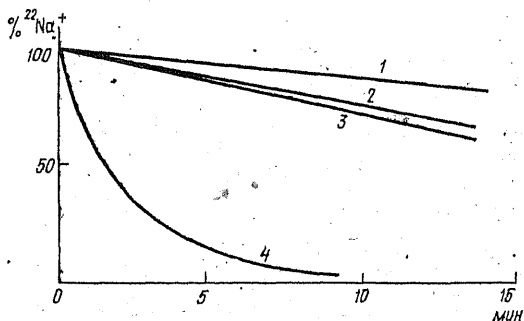
Многие фармакологические и химические исследования позволяют предполагать, что «каналы», переносящие катионы при возбуждении клетки, построены из белков. Высказываются даже предположения, что пассивный транспорт Na^+ и Ca^{2+} идет соответственно через Na^+ - и Ca^{2+} -насосы за счет их обращения. Показано, что протеолитические фрагменты Na^+ , K^+ -АТФазы и Ca^{2+} -АТФазы могут обладать высокоизбирательными ионофорными свойствами. Из мембран митохондрий выделены переносчики Ca^{2+} и фосфата. Установлено, что они являются полипептидами.

Возможно, мембранные рецепторы непосредственно участвуют в формировании «канала» для переноса катиона через мембрану. Холинергический рецептор имеет гидрофобные участки, поэтому может быть встроен в искусственную липидную мембрану. После добавления к такой мембране ацетилхолина под электронным микроскопом можно увидеть появление темных шариков диаметром 2 нм, представляющих собой, по мнению некоторых исследователей, «каналы», через которые движутся ионы. В пользу этого предположения свидетельствуют экспериментальные факты, показавшие, что очищенный холинергический рецептор может ускорять перенос Na^+ через искусственную липидную мембрану.

В водных растворах липиды образуют липосомы. Это пузырьки, состоящие из липидного бислоя, внутри и снаружи которого находится водный раствор. Если

формирование липосом проводить в присутствии радиоактивных ионов натрия, а затем отмыть липосомы от внешнего раствора и перенести в раствор, лишенный радиоактивности, то $^{22}\text{Na}^+$, захваченный липосомами и поэтому оставшийся внутри, будет медленно выходить в наружную среду по градиенту концентрации (рис. 66). Если в липидный бислой липосом встроить холинергический рецептор, то выход $^{22}\text{Na}^+$ из липосом ускорит-

Рис. 66. Влияние агонистов (карбахолин) и антагонистов (α -бунгаротоксин) холинергических рецепторов на проницаемость мембран протеолипосом, содержащих холинорецептор, для ионов Na^+ . Линия 1 отражает уровень $^{22}\text{Na}^+$ в липосомах, не содержащих холинергического рецептора, 2 — то же в присутствии холинорецептора, 3 — в присутствии холинорецептора, карбахолина и α -бунгаротоксина, 4 — в присутствии холинорецептора и карбахолина



ся в незначительной степени. Если же затем к липосомам (или протеолипосомам, так как они уже содержат белок) добавить ацетилхолин или его агонист, то выход $^{22}\text{Na}^+$ резко ускорится. Антагонисты холинергического рецептора (например, α -бунгаротоксин) полностью блокируют этот эффект агонистов (см. рис. 66). Предполагается, что связывание агониста снижает энергию активации конформационного перехода, который должен совершить холинорецептор, чтобы открыть канал для движения Na^+ через мембрану.

В физиологических условиях такое движение ионов совершается за миллисекунды, а в модельных опытах, как видно из рис. 66, за несколько минут. Эти различия могут объясняться тем, что скорость движения ионов определяется плотностью рецепторов на мембране, липидным составом мембраны и, возможно, наличием дополнительных компонентов мембраны, которые отсутствуют в модельной системе.

Имеются сообщения о том, что при наличии в среде

Ca^{2+} холинергический рецептор можно выделить в комплексе с Са-связывающим фактором, который имеет молекулярный вес, в 20 раз меньший, чем молекулярный вес всего комплекса. После обработки раствором, содержащим ЭДТА, этот фактор отделяется и рецептор утрачивает Са-связывающие свойства. Обнаружение Са-связывающего белка в составе сложной олигомерной молекулы холинергического рецептора позволяет предположить, что в физиологических условиях рецептор может осуществлять не только транспорт Na^+ , но и транспорт Ca^{2+} через мембрану.

Определенное сходство между эффектами холинергических (главным образом мускариновых) и α -адренергических агентов дает основание некоторым авторам предполагать, что сходны также механизмы функционирования их рецепторов.

В последние годы появились новые интересные данные о механизме действия инсулина. Несколько лет назад Куатреказес показал, что инсулин, ковалентно присоединенный к гранулам сефарозы, оказывает те же биологические эффекты, что и нативный гормон. Поскольку размеры гранул сефарозы во много раз превышают размеры клетки, предполагалось, что иммобилизованный инсулин вызывает свои эффекты, связываясь с рецепторами плазматической мембраны. Эти опыты многократно воспроизводили и другие авторы, причем в такой постановке, которая исключала отщепление инсулина от носителя в процессе инкубации с клетками. Поэтому в настоящее время большинство исследователей склоняется к тому, что первым этапом действия инсулина на клетку является его взаимодействие с мембранным рецептором.

Очищенный рецептор инсулина представляет собой белок с радиусом Стокса 72 Å и молекулярным весом 300 000. При электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия белок распадается на субъединицы, основная из которых имеет молекулярный вес 135 000. Изоэлектрическая точка рецептора равна 4,0. По-видимому, это гликопротеид, так как он связывается с конкавалин А-агарозой и затем специфически элюируется α -метилманнопиранозидом.

В плазматических мембранах, содержащих рецептор инсулина, обнаружена протеинкиназа, которая активируется инсулином (рис. 67). Эта активация, по-ви-

димому, не опосредуется образованием какого-либо низкомолекулярного посредника, подобного циклическим нуклеотидам. Добавление ГТФ значительно усиливает активирующее влияние инсулина на мембранную протеинкиназу. На основании анализа действия синтетических аналогов ГТФ и других гуаниловых нуклеотидов высказано предположение, что в процессе передачи сигнала от рецептора инсулина на протеинкиназу участвует ГТФ-связывающий белок, подобный тому,

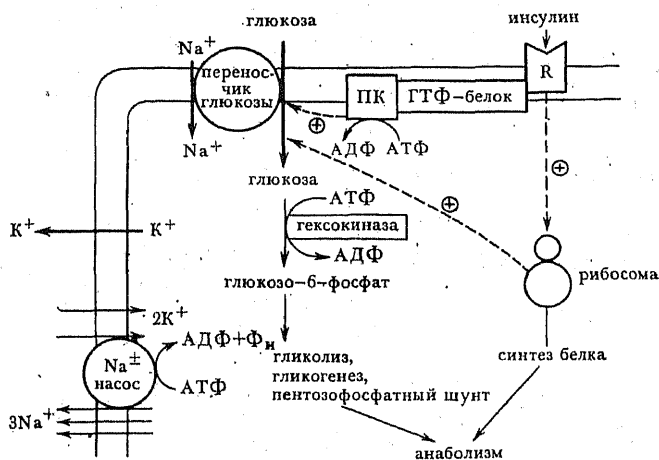


Рис. 67. Основные пути влияния инсулина на метаболизм углеводов и белков в клетке. Пунктирными линиями указаны стимулирующие эффекты

который участвует в функциональном сопряжении мембранных рецепторов с аденилатциклазой (см. рис. 63). Протеинкиназа, стимулируемая инсулином, фосфорилирует несколько низкомолекулярных мембранных белков. Параллельно фосфорилированию возрастает скорость транспорта глюкозы в клетку, поэтому предполагается, что эти белки (или один из них) либо сами являются переносчиками, либо влияют на переносчик глюкозы в мембране. Энергией для такого переноса служит электрохимический градиент ионов Na⁺ (см. раздел 1.2), вследствие чего этот процесс существенно зависит также от активности Na⁺-насоса, выносящего Na⁺ из клетки.

Инсулин влияет также на синтез белков, изменяя, по-видимому, скорость трансляции. После инкубации с инсулином в клетках происходит фосфорилирование рибосомального белка 6S с молекулярным весом 31 000. Фосфорилирование этого белка достигает максимума уже спустя 5 мин после инкубации клеток с инсулином. Этот процесс коррелирует с ускорением транспорта глюкозы, однако весьма вероятно, что он имеет отношение и к белковому синтезу. Фосфорилирование рибосомального белка подавляется антителами на инсулин, но ускоряется антителами на инсулиновый рецептор. Циклические нуклеотиды и Ca^{2+} не имитируют этого эффекта. В то же время, экстракт из клеток, преинкубированных с инсулином, также вызывает фосфорилирование белка 6S. Возможно, при связывании инсулина с рецептором в клетке образуются неизвестные пока посредники («вторичные мессенджеры»). Существует предположение, что под действием инсулина от рецептора отщепляется фрагмент (короткий пептид), который покидает плазматическую мембрану, проникает в цитоплазму и осуществляет свое регуляторное влияние на внутриклеточные структуры. Нельзя исключить и того, что инсулин вызывает выход протеинкиназы из мембраны и последующее взаимодействие с рибосомой.

Инсулину свойственны «множественные» эффекты: стимуляция транспорта в клетку сахаров, аминокислот, жирных кислот, ионов и предшественников нуклеиновых кислот, активация и ингибирование ферментов цитоплазмы, ретикулума и митохондрий, подавление протеолиза, ускорение белкового синтеза, изменение скоростей синтеза ДНК и РНК.

Известно, что инсулин может избирательно подавлять синтез некоторых белков, например ферментов глюконеогенеза в печени. Механизмы его репрессирующего действия не ясны. Инсулин подавляет активацию аденилатциклазы глюкагоном и адреналином. Объяснение этому эффекту может быть найдено, если окажется, что рецептор инсулина может конкурировать с другими мембранными рецепторами за один и тот же ГТФ-связывающий белок мембраны. В опытах *in vitro* обнаружено ингибирующее влияние инсулина на фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов, а также на связывание цАМФ с протеинкиназами. Поскольку эти

ферменты преимущественно локализованы в цитоплазме, а кроме того, имеют сравнительно низкое сродство к инсулину, биологическое значение этих эффектов подвергается сомнению.

Рецепторы соматомединов, по-видимому, также локализованы в цитоплазматической мембране. Вызывая фосфорилирование этих мембран, они ускоряют поступление глюкозы, аминокислот и минеральных веществ в мышечную и жировую ткани. Кроме того, соматомедины вызывают пролиферацию фибробластов, стимулируют превращение остатков пролина в оксипролин в составе белков хрящевой ткани, а также стимулируют включение сульфата в мукополисахариды хряща. В этих тканях сродство мембранных рецепторов к соматомединам в 100 раз больше, чем к инсулину. Гиалуронидаза, нейраминидаза и фосфолипаза С не влияют на рецепторы соматомединов, а проназа разрушает их. Интересно, что дибутирильное производное цАМФ и теofilлин (см. раздел 1.3) могут имитировать некоторые эффекты соматомединов: усиливать транспорт аминокислот, образование РНК и белков, вызывать сульфирование белков в хрящевой ткани. Все эти эффекты, независимо от того, чем они вызваны — соматомединами или цАМФ, блокируются аденозином. В этой связи уместно отметить, что влияние цАМФ на липолиз в жировых клетках также блокируется аденозином.

Гормоны и нейромедиаторы, изменяющие концентрацию циклических нуклеотидов в клетке (см. раздел 1.3), как правило, не оказывают существенного влияния на проницаемость биологических мембран для метаболитов, но являются эффективными регуляторами как активного, так и пассивного транспорта ионов. Путем цАМФ-зависимого фосфорилирования белков повышается активность Na^+ -насоса в плазматической, а Ca^{2+} -насоса — в ретикулярной мембране (см. раздел 4.2.3). Весьма неоднозначны эффекты цАМФ на проницаемость плазматической мембраны. Так, например, в тучных клетках цАМФ препятствует пассивному входу Ca^{2+} , в клетках миокарда может активировать и вход и выход Ca^{2+} , а в эритроцитах вызывает вход Ca^{2+} в клетку. Эти эффекты развиваются преимущественно за счет фосфорилирования мембранных белков.

Характер влияния цАМФ на проницаемость плаз-

матической мембраны может зависеть от величины ионных градиентов, концентрации цАМФ, других регуляторов. Так, в сердце при определенных концентрациях цАМФ стимулируется активный транспорт Ca^{2+} из клетки. При больших концентрациях цАМФ ускоряется вход Ca^{2+} через медленные (независимые от потенциала) каналы плазматической мембраны. Показано, что при этом происходит фосфорилирование сарколеммы, в результате чего усиливается связывание Ca^{2+} с мембраной, однако не ясно, имеет ли это фосфорилирование отношение к повышению концентрации Ca^{2+} в миоплазме.

В ряде случаев фосфорилирование немембранных белков может изменять их сродство к ионам Ca^{2+} . В том случае, если биологический эффект опосредуется этими белками, такое фосфорилирование будет имитировать эффект повышения концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Например, сродство кальмодулина, входящего в состав киназы фосфорилазы (см. раздел 4.2.3), к ионам Ca^{2+} значительно возрастает после цАМФ-зависимого фосфорилирования фермента. Таким образом, фосфорилирование киназы фосфорилазы окажет такое же влияние на гликогенолиз, как и вход Ca^{2+} в клетку.

Следует отметить также, что мембранные рецепторы, регулирующие аденилатциклазу, могут и непосредственно, без реакций цАМФ-зависимого фосфорилирования, влиять на проницаемость мембран для ионов. Долгое время считалось, что все эффекты β -адренергических рецепторов опосредуются образованием цАМФ. В последние годы установлено, что в эритроцитах птиц β -рецепторы повышают проницаемость мембран для Ca^{2+} (или вызывают высвобождение Ca^{2+} из мембраны), а в ряде тканей тормозят активный транспорт Mg^{2+} с помощью механизмов, независимых от цАМФ.

Проницаемость может быть изменена не только путем непосредственного воздействия на мембрану, но и за счет изменения состояния цитоплазматических белков. Известно, что антидиуретический гормон, активирующий транспорт воды через апикальную мембрану дистальных канальцев почки, изменяет вязкость мембраны. Этот гормон активирует аденилатциклазу почек, а его биологические эффекты можно полностью воспроизвести с помощью других агентов, повышающих концентрацию цАМФ в клетке. Разрушение микротру-

бочек и микрофиламентов устраняет влияние гормона как на транспорт Na^+ и воды, так и на вязкость мембраны. Поэтому предполагается, что влияние антидиуретического гормона на проницаемость мембран почек полностью опосредуется цАМФ-зависимым фосфорилированием тубулина и других белков, что приводит к стабилизации структуры микротрубочек и микрофиламентов, регулирующих вязкость мембраны и ее проницаемость.

Широко известна гипотеза Гинецинского, согласно которой антидиуретический гормон стимулирует секрецию гиалуронидазы, которая затем отщепляет гиалуроновую кислоту на поверхности клеток почечных канальцев. Действительно, этот гормон вызывает повышение концентрации гиалуронидазы в моче. Однако обработка изолированных клеток почки или мочевого пузыря жабы гиалуронидазой не влияет на транспорт Na^+ и H_2O через мембраны.

Влияние альдостерона на транспорт Na^+ в почках опосредуется индукцией синтеза белков, непосредственно участвующих в переносе ионов через мембрану.

Высказывалось предположение, что простагландины группы *F* повышают проницаемость мембран для Ca^{2+} , действуя как ионофоры, т. е. встраиваясь в липидный бислой и тем самым создавая «канал» для Ca^{2+} . В последние годы появляются данные, свидетельствующие о том, что в этом процессе участвуют специфические мембранные рецепторы для простагландинов.

Нейромедиаторы, действующие на клетку путем открывания ионных каналов, вызывают биологический эффект в течение миллисекунд. Столь быстрый эффект, возможно, объясняется тем, что рецепторы нейромедиаторов сами формируют канал. Кроме того, рецепторы нейромедиаторов сконцентрированы на малом участке мембраны, поэтому при связывании агонистов создаются высокие локальные токи, способные вызывать возбуждение всей клеточной мембраны.

Влияние гормонов на проницаемость мембран, по видимому, опосредуется химическими процессами, приводящими к изменению состояния переносчиков или каналов. Кроме того, рецепторы гормонов, как правило, распределены диффузно по всей поверхности клеточной мембраны. Поэтому от момента связывания гормона с рецептором до регистрируемых изменений транс-

порта ионов или метаболитов проходят десятки секунд или минут.

Изменение проницаемости мембран является одним из наиболее эффективных способов усиления регуляторного сигнала. При связывании одной молекулы гормона или его агониста с рецептором возникают условия для перемещения через мембрану тысяч ионов или других молекул. Каждая молекула, вошедшая в клетку, может взаимодействовать с ферментом или регуляторным белком, изменяя их активность. При этом достигается дополнительное усиление сигнала, так как при повышении или понижении активности ферментов или заряда на мембране изменяются скорости протекания биохимических процессов, а также функциональное состояние клетки.

4.2.

ГОРМОНЗАВИСИМОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ

Из всех методов химической модификации биополимеров в клетке (см. раздел 1.3) наиболее хорошо изучены процессы фосфорилирования белков. Ряд протеинкиназ, катализирующих эту реакцию, регулируется циклическими нуклеотидами. Действуя на клетку через мембранные рецепторы, некоторые гормоны и нейромедиаторы изменяют скорость синтеза цАМФ или цГМФ, в результате чего в клетке возрастает или снижается количество фосфорилированных белков (либо степень фосфорилирования). Так как ковалентное присоединение фосфата влияет на каталитические свойства ферментов и на функциональные свойства других белков, фосфорилирование, опосредуемое образованием циклических нуклеотидов, служит одним из важных механизмов нейрогуморальной регуляции.

4.2.1.

ЦИКЛАЗЫ

Синтез цАМФ из АТФ катализирует аденилатциклаза — интегральный белок плазматических мембран, активный центр которого расположен на внутренней стороне мембраны. Аденилатциклаза есть практически во всех клетках животного организма. Этот фермент

не удалось выявить только в эритроцитах человека и в некоторых мутантных линиях культивируемых клеток. Обнаружено несколько десятков природных активаторов аденилатциклазы, в числе которых гормоны, гормоноподобные вещества, нейромедиаторы и токсины. Чувствительность аденилатциклазы к этим веществам полностью определяется наличием соответствующих рецепторов в плазматической мембране клетки. Известно и ингибирующее влияние некоторых веществ на аденилатциклазу. К числу таких ингибиторов относятся опиоиды, α -адренергические агенты, холинергические агенты мускариновой природы и аденозин. Эффекты этих веществ также тканеспецифичны.

В передаче сигнала от мембранного рецептора на аденилатциклазу принимает участие ГТФ-связывающий белок (*N*-белок). Долгое время роль гуаниловых нуклеотидов в этом процессе была скрыта от внимания исследователей, так как сродство ГТФ-связывающего белка к нуклеотиду чрезвычайно высоко — в присутствии 10^{-7} М ГТФ наблюдается полумаксимальная активация гормонстимулированной аденилатциклазы. Мембраны, а также препараты АТФ, используемые для измерения активности аденилатциклазы, как правило, содержат примеси ГТФ и других гуаниловых нуклеотидов в количествах, достаточных для максимального развития их эффекта на фермент.

Для выяснения механизма функционального сопряжения гормональных рецепторов с аденилатциклазой и роли гуаниловых нуклеотидов в этом процессе Гилман применил удобную модель — клетки S 49 лимфомы мышей. Для этих клеток цАМФ является цитостатиком: повышение концентрации цАМФ внутри клеток останавливает их рост и вызывает гибель. Это свойство клеток позволило выделить несколько генетических вариантов, не отвечающих повышением концентрации цАМФ на добавление в среду катехоламинов. Оказалось, что синтез цАМФ под действием катехоламинов не может происходить в одном из трех случаев: когда отсутствуют β -адренергические рецепторы, аденилатциклаза или ГТФ-связывающий белок. Реконструкция мембран мутантных клеток с факторами, утерянными этими клетками, но выделенными из клеток дикого типа, полностью восстанавливала гормончувствительный синтез цАМФ.

Опыты по слиянию клеток, содержащих разные рецепторы (см. раздел 3.3), результаты разделения компонентов аденилатциклазного комплекса и их последующей реконструкции также показали, что рецепторы, аденилатциклаза и ГТФ-зависимый сопрягающий фактор являются разными белками, способными взаимодействовать между собой под действием гормонов и гуаниловых нуклеотидов (см. рис. 17).

В клетках некоторых бактерий аденилатциклаза находится в растворимом состоянии, причем ее содержание сравнительно высоко. Благодаря этому бактериальную аденилатциклазу удалось выделить в гомогенном виде. Однако бактериальный фермент нечувствителен ни к действию гормонов, ни к действию гуаниловых нуклеотидов. В тканях животных содержание аденилатциклазы крайне низко. В очищенных мембранных препаратах ее активность не превышает 100 пмоль/мг белка в 1 мин, что по крайней мере в 1000 раз ниже активности других мембранных ферментов, например АТФаз. Кроме того, после солюбилизации мембраны, в которую встроена аденилатциклаза животных клеток, фермент утрачивает чувствительность к гормональной регуляции. Все это затрудняет изучение механизмов функционирования гормончувствительного аденилатциклазного комплекса.

В исследовании свойств аденилатциклазы животных клеток широко применяют негидролизуемые аналоги гуаниловых нуклеотидов (например, $Gpp(NH)p$, единственное отличие которого от ГТФ заключается в том, что вместо кислорода между γ - и β -фосфатами расположена иминогруппа) и холерный токсин. Холерный токсин представляет собой олигомерный белок с молекулярным весом 87 000, состоящий из одной субъединицы A и 5 субъединиц B (молекулярный вес каждой 11 600). Субъединица A состоит из двух полипептидов (A_1 — 23 500 и A_2 — 5 500), соединенных $S-S$ -связью. Первым этапом в действии холерагена на клетку является связывание со специфическим рецептором ганглиозидом G_{M1} . Это связывание осуществляется через субъединицу B (холерагеноид). Спустя несколько минут после связывания, субъединица A оказывается встроенной в мембрану, а затем, по-видимому, происходит восстановление $S-S$ -связи и расщепление субъединицы A на две молекулы — A_1 и A_2 . Белок A_1

обладает ферментативной активностью — гидролизует НАД⁺ с образованием АДФ-рибозы и никотинамида. В присутствии белковых субстратов (полиаргинина, гистонов, лизоцима или ГТФ-связывающего белка мембран) реакция гидролиза НАД⁺, катализируемая субъединицей А₁, завершается образованием АДФ-рибозил-белка и свободного никотинамида. Считается, что АДФ-рибоза присоединяется к гуанидиновой группе аргинина, входящего в состав белка.

Белок, передающий регуляторный сигнал от мембранных рецепторов на аденилатциклазу, может гидролизовать ГТФ. После АДФ-рибозилирования его ГТФазная активность подавляется. Применение меченого НАД⁺ и холерного токсина позволяет специфически метить ГТФ-связывающий белок, а затем и выделять его. Оказалось, что он имеет олигомерную природу и состоит из субъединиц разного молекулярного веса. Молекулярная организация этого сложного белка зависит от многих лигандов, связывающихся с ним или с мембранным рецептором; а его молекулярный вес превышает 100 000. В сопряжении каталитической субъединицы аденилатциклазы с рецептором и в ее регуляции внутриклеточными агентами участвуют несколько субъединиц ГТФ-связывающего белка: в печени крысы — белки с молекулярным весом 52 000, 45 000 и 35 000, а в эритроцитах — 45 000 и 35 000. АДФ-рибозилированию подвергаются только две из субъединиц — с молекулярным весом 52 000 и 45 000, субъединица с молекулярным весом 35 000 не является субстратом АДФ-рибозилтрансферазы, но, образуя, по-видимому, комплекс с белком с молекулярным весом 45 000, значительно облегчает АДФ-рибозилирование последнего.

Отделение ГТФ-связывающего белка от каталитической субъединицы аденилатциклазы лишает фермент способности синтезировать цАМФ из MgATФ, однако замена Mg²⁺ на Mn²⁺ возвращает каталитическому белку его активность. ГТФ-связывающий белок не обладает видовой или тканевой специфичностью: добавление его восстанавливает каталитическим субъединицам разных тканей чувствительность к гуаниловым нуклеотидам, а также способность синтезировать цАМФ из истинного субстрата — MgATФ.

На основании данных по кинетике действия на аденилатциклазу гормонов и гуаниловых нуклеотидов, опы-

тов по ультрацентрифугированию аденилатцикласного комплекса, солюбилизованного в разных функциональных состояниях, а также результатов разделения и реконструкции белков, составляющих аденилатцикласный комплекс, возникли следующие представления о механизме регуляции синтеза цАМФ. Для перехода аденилатциклазы в активное состояние необходимо взаимодействие каталитической субъединицы фермента

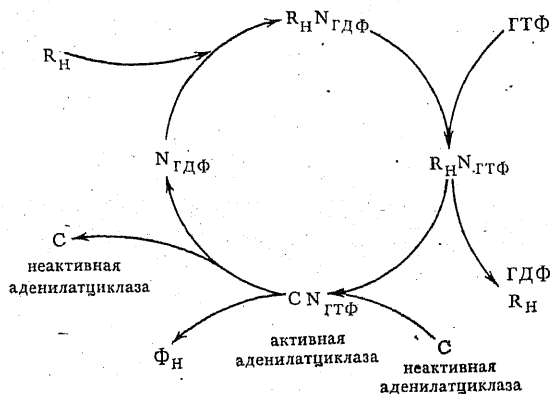


Рис. 68. Схема регуляции активности аденилатциклазы эритроцитов птиц по Пфойфферу: Н — гормон, R — рецептор, N — ГТФ-связывающий белок, C — каталитическая субъединица аденилатциклазы

с ГТФ-связывающим белком (N-белок). Это взаимодействие возможно только в том случае, если в нуклеотидсвязывающем центре N-белка находится ГТФ. Гидролиз ГТФ до ГДФ и Ф_H лишает N-белок способности взаимодействовать с каталитической субъединицей, в результате чего аденилатциклаза переходит в неактивное состояние. Роль гормонального рецептора в активации аденилатциклазы сводится лишь к облегчению взаимодействия каталитической субъединицы с N-белком путем замены ГДФ на ГТФ в нуклеотидсвязывающем центре последнего (рис. 68).

В эритроцитах птиц, аденилатцикласная система которых изучена наиболее полно, гуаниловые нуклеотиды активируют аденилатциклазу только в присутствии гормона. Поэтому Пфойффер предположил, что нуклеотидсвязывающий центр N-белка постоянно занят гуаниловым нуклеотидом. Гормон через свой специфиче-

$$\begin{array}{ccc}
 & N & \\
 \swarrow K_3 & & \nwarrow K_2 \\
 C \sim N \cdot GT\Phi & \xrightarrow{K_1} & N \cdot GT\Phi \\
 \uparrow K_7 & & \downarrow K_4 \\
 HR \sim N \cdot GT\Phi & & HR \sim N \cdot GT\Phi \\
 \swarrow K_6 & & \nwarrow K_5 \\
 & N \sim RH &
 \end{array}$$
$$\begin{array}{ccc}
 & N & \\
 \swarrow K_3 & & \nwarrow K_2 \\
 C \sim N \cdot GT\Phi & \xrightarrow{K_1} & N \cdot GT\Phi \\
 \uparrow K_7 & & \downarrow K_4 \\
 HR \sim N \cdot GT\Phi & & HR \sim N \cdot GT\Phi \\
 \swarrow K_6 & & \nwarrow K_5 \\
 & N \sim RH &
 \end{array}$$

В тканях млекопитающих гуаниловые нуклеотиды могут влиять на активность аденилатциклазы и в отсутствие гормона, гормон лишь ускоряет замещение одного гуанилового нуклеотида на другой (например ГДФ на ГТФ). Гилман предложил модификацию модели Кассела — Селинжера — Пфойффера, основываясь на некоторых особенностях регуляции аденилатциклазы у млекопитающих (рис. 69). По его мнению, комплекс $N \cdot R - N \cdot GTF$ существует лишь как переходный. Фактором, переводящим каталитическую субъединицу аденилатциклазы (C) в активное состояние, является N -белок в комплексе с ГТФ ($N \cdot GTF$). Гидролиз ГТФ N -белком (K_1) вызывает переход аденилатциклазы в неактивное состояние — каталитическая субъединица отщепляется. Обычно K_1 не лимитирует всего процесса, но при использовании негидролизующих аналогов ГТФ или холерного токсина K_1 снижается, и концентрация $N \cdot GTF$ растет. Неизвестно, обладает ли свободный (без каталитической субъединицы) N -белок ГТФазной активностью.

Основываясь на аналогии с фактором элонгации, который приобретает ГТФазную активность только после связывания с рибосомой, можно предположить, что в аденилатциклазном комплексе ГТФ гидролизуеться только белковым комплексом $N-C$. В отсутствие гормона лимитирующей стадией в образовании комплекса N -ГТФ (а следовательно, активной аденилатциклазы) является процесс диссоциации ГДФ от N -белка ($K_2 \gg \gg K_{-2}$). В эритроцитах птиц, по-видимому, $K_{-2} = 0$, поэтому гуаниловые нуклеотиды в отсутствие гормона не влияют на активность фермента. В отличие от гипотезы Кассела и Селинжера, согласно которой действие гормона направлено на реакцию связывания ГТФ, модель Гилмана предполагает, что гормон облегчает диссоциацию ГДФ. Такое предположение более логично. Гуаниловые нуклеотиды оказывают отрицательное гетеротропное влияние на связывание гормона с рецептором (см. раздел 3.3). Согласно термодинамике, этот эффект должен быть реципрокным, т. е. если гуаниловые нуклеотиды уменьшают сродство рецептора к гормону, то гормон может уменьшать сродство ГТФ-белка к гуаниловым нуклеотидам. Обмен гуаниловых нуклеотидов, благодаря участию рецептора протекает значительно быстрее. Образование нестабильного комплекса $HR-N \cdot ГДФ$ вызывает быструю диссоциацию (K_{-5}) нуклеотида от белка ($K_{-5} > K_{-2}$).

Скорость перехода аденилатциклазы в активное состояние определяется скоростями связывания гормона с рецептором, замещения ГДФ на ГТФ и образования комплекса между N -белком и каталитической субъединицей фермента. Переход аденилатциклазы из активного состояния в неактивное определяется прежде всего скоростью гидролиза ГТФ N -белком. От соотношения констант всех этих реакций зависит соотношение активной и неактивной форм аденилатциклазы ($C-N : C$), что, в конечном итоге, определит скорость синтеза цАМФ в клетке.

Подобно тому, как изменение константы связывания гормона с рецептором или концентрации рецепторов влияет на чувствительность клетки к гормону (см. раздел 3.4), воздействия разных факторов на ту или иную реакцию в многоступенчатом процессе регуляции активности аденилатциклазы (см. рис. 69) могут вызывать усиление или ослабление «функционального со-

пряжения» рецептора с ферментом, что также приведет к изменению чувствительности клетки к гормону.

На мембранном препарате сердца в отсутствие добавленных нуклеотидов можно наблюдать практически полное совпадение сродства рецепторов и аденилатциклазы к изопротеренолу. При добавлении в инкубационную среду $Gpp(NH)p$ сродство рецептора к изопротеренолу уменьшается (отрицательное гетеротропное влияние гуаниловых нуклеотидов на рецептор, см. рис. 55), а сродство аденилатциклазы к изопротеренолу возрастает. При выражении этих данных в координатах: зависимость активации аденилатциклазы от оккупации рецепторов гормоном (рис. 70), видно, что в отсутствие добавленных гуаниловых нуклеотидов

между активацией аденилатциклазы гормоном и связыванием этого гормона с рецептором наблюдается прямо пропорциональная зависимость. В присутствии $Gpp(NH)p$ для полумаксимальной активации аденилатциклазы достаточно оккупация гормоном лишь 5—10% рецепторов. $Gpp(NH)p$ не может гидролизаться ГТФазой N -белка, поэтому аденилатциклаза переходит в стабильное активное состояние. Гормон-рецепторный комплекс, совершив один цикл активации аденилатциклазы, выходит из этой реакции неизменным (см. рис. 68 и 69) и, по-видимому, в состоянии повторить тот же процесс. В результате этого для перевода фермента в активное состояние становится достаточным малое количество гормон-рецепторного комплекса. Полупериод жизни комплекса между катехоламином и β -адренергическим рецептором составляет около 5 мин, а константа скорости перехода

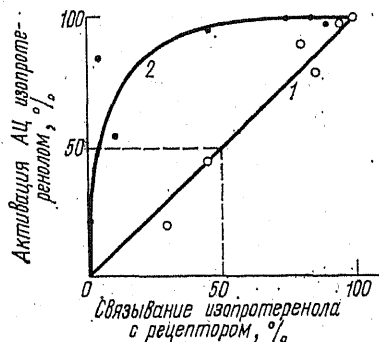


Рис. 70. Зависимость активирующего влияния изопротеренола на аденилатциклазу сердца кролика от связывания изопротеренола с β -адренергическим рецептором. Максимальный активирующий эффект, а также максимальное насыщение рецепторов изопротеренолом приняты за 100%, 1 — без гуаниловых нуклеотидов, 2 — в присутствии 10^{-4} М $Gpp(NH)p$

аденилатциклазы достаточно оккупация гормоном лишь 5—10% рецепторов. $Gpp(NH)p$ не может гидролизаться ГТФазой N -белка, поэтому аденилатциклаза переходит в стабильное активное состояние. Гормон-рецепторный комплекс, совершив один цикл активации аденилатциклазы, выходит из этой реакции неизменным (см. рис. 68 и 69) и, по-видимому, в состоянии повторить тот же процесс. В результате этого для перевода фермента в активное состояние становится достаточным малое количество гормон-рецепторного комплекса. Полупериод жизни комплекса между катехоламином и β -адренергическим рецептором составляет около 5 мин, а константа скорости перехода

аденилатциклазы из неактивного состояния в активное равна $0,4-1,0 \text{ мин}^{-1}$. Это значит, что одна и та же молекула гормон-рецепторного комплекса потенциально способна перевести в активное состояние около 10 молекул аденилатциклазы.

Гуаниловые нуклеотиды обеспечивают усиление гормонального сигнала путем изменения соотношения между количеством активированных рецепторов и количеством активированных молекул аденилатциклазы. В опытах, представленных на рис. 70, в качестве ингибитора ГТФазы использовали Gpp(NH)p. В клетке эту функцию, возможно, выполняет специальный фермент АДФ-рибозилтрансфераза.

Роль АДФ-рибозилтрансферазы в регуляции активности аденилатциклазы изучена с помощью холерного токсина. Как уже отмечалось, действие холерного токсина объясняется АДФ-рибозилтрансферазной активностью его субъединицы A_1 . При АДФ-рибозилировании практически полностью подавляется ГТФазная активность N -белка, в результате чего повышается стационарный уровень активной формы аденилатциклазы.

АДФ-рибозилтрансфераза, подобная той, которая входит в состав холерагена, обнаружена в термолabileм энтеротоксине *E. coli*. Этот белок также активирует аденилатциклазу по НАД-зависимому механизму. Близкими свойствами обладают также дифтерийный токсин и экзотоксин A псевдомонад. АДФ-рибозилтрансфераза обнаружена также в тканях животных. Этот фермент оказывает на аденилатциклазу эффекты, подобные тем, которые вызывает холераген. Таким образом, есть основания считать, что в клетках позвоночных функционирует фермент, регулирующий функциональное сопряжение мембранных рецепторов с аденилатциклазой. Интересно отметить, что субъединица A_1 холерного токсина является субстратом для протеинкиназ. Не исключено, что АДФ-рибозилтрансфераза тканей позвоночных — регулируемый фермент, через который замыкается обратная связь в реакциях гормон-зависимого синтеза циклических нуклеотидов.

В отличие от аденилатциклазы, которая локализована в плазматической мембране, гуанилатциклаза, синтезирующая цГМФ из ГТФ, находится как в мембраносвязанном, так и в растворимом состоянии. Соотношения этих двух форм фермента в различных тканях

разные. Так, например, 90% активности гуанилатциклазы клеток тонкого кишечника выявляется в мембранной фракции, а 10% — в цитозоле. В легких и печени лишь 20% активности гуанилатциклазы находится в мембранах, а 80% — в цитозоле. Молекулярные веса растворимой и связанной с мембранами гуанилатциклазы разные. Кроме того, две формы фермента различаются кинетически: у растворимой формы зависимость активности от концентрации ГТФ подчиняется нормальной кинетике Михаэлиса — Ментен, а у мембранной — характеризуется положительной кооперативностью. В то же время показано, что некоторые внеклеточные регуляторы могут влиять на перераспределение гуанилатциклазы между мембранами и цитоплазмой. Поскольку отщепление от мембран, как правило, активирует фермент, воздействие на компартментализацию гуанилатциклазы может быть важным регуляторным фактором, изменяющим содержание цГМФ в клетке.

Гуанилатциклазу удается выявить в различных субклеточных структурах, например в тщательно очищенных ядрах печени и матки. Изменение функционального состояния ткани также влияет на внутриклеточную локализацию гуанилатциклазы. При регенерации печени отмечается 2—3-кратное повышение активности фермента в мембранах, в том числе и в ядерных.

Впервые регуляцию гуанилатциклазы нейромедиаторами описал Сазерленд. При инкубации тканей с ацетилхолином в растворах, содержащих Ca^{2+} , происходило быстрое повышение концентрации цГМФ. В отсутствие Ca^{2+} эффект ацетилхолина исчезал. На основании этого был сделан вывод, что ацетилхолин активирует гуанилатциклазу и эта активация опосредуется входом Ca^{2+} в клетку (см. рис. 18). Позже данная гипотеза была экспериментально доказана. Следует, однако, отметить, что этот механизм не является универсальным для всех нейромедиаторов. Так, например, серотонин может активировать синтез цГМФ в гладких мышцах артерий человека, и этот процесс протекает при отсутствии Ca^{2+} в омывающей среде.

Особого внимания заслуживает регуляция гуанилатциклазы окислительно-восстановительными процессами. Открытие этого механизма регуляции было сделано при изучении действия на фермент NaN_3 . Преинкуба-

ция гуанилатциклазы с азидом приводит к 30-кратному ускорению синтеза цГМФ. Данный эффект воспроизводился не на всех тканях. Из печени был выделен белковый фактор, который придавал гуанилатциклазе любой ткани чувствительность к активирующему действию азидов. Было обнаружено, что этот фактор является пероксидазой, которая способна превращать азид в NO , а окись азота активирует гуанилатциклазу. Так был открыт механизм активирующего действия на фермент многих нитросоединений (например, нитропрусида и ряда канцерогенов).

Роль окислительно-восстановительных реакций в регуляции синтеза цГМФ не ограничивается нитросоединениями. Гуанилатциклаза активируется под действием кислорода и H_2O_2 . Жирные кислоты и продукты их перекисного окисления также активируют гуанилатциклазу. Многие агенты, стимулирующие окислительные процессы в мембране, приводят к резкому повышению концентрации цГМФ в клетке.

Активность гуанилатциклазы в разных тканях не превышает 1—2 пмоль мкг белка в 1 мин. Это объясняется, по-видимому, крайне низким содержанием фермента. Концентрация цГМФ в клетке также низка (в 4—10 раз ниже концентрации цАМФ) — около 10^{-7} М. При активации синтеза или подавлении распада цГМФ концентрация этого нуклеотида в клетке обычно повышается в 3—8 раз.

4.2.2.

ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ

Фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов не обладают абсолютной специфичностью в отношении субстратов — в подавляющем большинстве случаев одна и та же форма фермента способна гидролизовать как цАМФ, так и цГМФ. Соотношение скоростей гидролиза этих двух нуклеотидов может быть существенно разным. Оно зависит от формы фермента (есть более специфичные в отношении цАМФ и есть более специфичные в отношении цГМФ), от соотношения концентраций цАМФ и цГМФ в клетке и от действия регуляторов фосфодиэстеразы.

Фосфодиэстеразы — в основном растворимые ферменты. Содержание форм, связанных с внутриклеточ-

ными структурами (мембранами, а также микротрубочками), составляет в разных объектах 5—40%.

Константы Михаэлиса (K_m) фосфодиэстераз для цАМФ и цГМФ составляют 10^{-6} — 10^{-4} М. Концентрация же в клетке этих субстратов ниже значения K_m (10^{-7} — 10^{-6} М), следовательно, в клетке фосфодиэстеразы функционируют в условиях неполного насыщения субстратом.

Константа Михаэлиса аденилатциклазы для АТФ составляет около 10^{-4} М, а концентрация АТФ в клетке равна $(3-5) \cdot 10^{-3}$ М. Гуанилатциклаза также обычно не испытывает дефицита в субстрате. Фосфодиэстеразы, напротив, никогда не находятся в максимально активном состоянии. По мере повышения концентрации цАМФ или цГМФ в клетке ускоряется гидролиз этих нуклеотидов.

При низкой «физиологической» концентрации цАМФ активность фосфодиэстеразы оказывается равной активности неактивированной аденилатциклазы. Показано, что даже в состоянии покоя в клетке идет постоянный синтез и гидролиз цАМФ. Благодаря одинаковым активностям фосфодиэстеразы и аденилатциклазы, содержание цАМФ может долго поддерживаться на одном и том же уровне. При активации аденилатциклазы гормоном скорость синтеза начинает превышать скорость деградации, в результате чего содержание цАМФ повышается. Однако повышение концентрации цАМФ приводит к ускорению гидролиза, так как достигается лучшее насыщение фосфодиэстеразы циклическим нуклеотидом. Поэтому при быстром ускорении синтеза цАМФ происходит медленное (в течение десятков секунд или минут) повышение содержания циклического нуклеотида в клетке.

Следует отметить, что сродство к циклическим нуклеотидам у цАМФ- и цГМФ-зависимых протеинкиназ (см. раздел 4.2.3) в 100—1000 раз больше, чем у фосфодиэстераз. По мнению Кребса, при ускорении синтеза сначала происходит насыщение циклическими нуклеотидами регуляторных центров протеинкиназ и лишь затем — ускоренный гидролиз нуклеотидов фосфодиэстеразами. Действительно, фосфодиэстеразную реакцию, идущую в пробирке, можно остановить добавлением протеинкиназы, которая связывает циклический нуклеотид и тем самым защищает его от гидролиза.

Благодаря сравнительно низкому сродству фосфодиэстераз к субстратам, эти ферменты могут осуществлять контроль за максимальной степенью повышения концентрации циклического нуклеотида в клетке. Даже при необратимой активации аденилатциклазы (например, холерным токсином), когда синтез цАМФ ускорен в 5—10 раз и протекает с такой скоростью в течение нескольких часов и даже суток, содержание цАМФ в

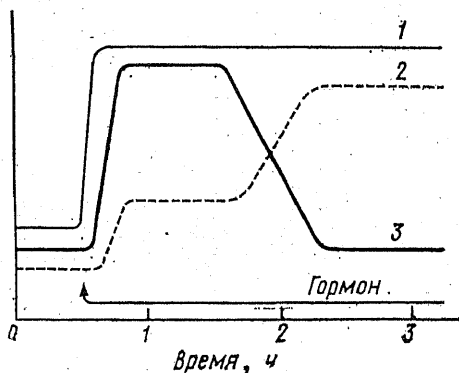


Рис. 71. Типичная зависимость активностей аденилатциклазы (1), фосфодиэстеразы (2) и содержания цАМФ (3) от времени инкубации ткани с гормоном. Объяснения см. в тексте

клетке возрастает лишь в несколько раз. Это достигается за счет того, что при определенной концентрации цАМФ скорость гидролиза также ускоряется в 5—10 раз за счет большего насыщения фосфодиэстеразы субстратом.

Через специальные регуляторные механизмы циклические нуклеотиды могут резко повысить активность фосфодиэстераз до уровня, превышающего активность циклаз, и тогда содержание цГМФ и цАМФ в клетке будет снижаться, несмотря на ускоренный синтез. Во многих типах клеток можно наблюдать, что длительная стимуляция аденилатциклазы приводит к трехфазному изменению концентрации цАМФ: повышение концентрации сменяется выходом на плато, а затем снижением до исходного уровня (рис. 71). Рассмотрим роль разных регуляторных механизмов в этих процессах.

Мы видели, что гормон, активирующий аденилатциклазу, опосредованно (через повышение концентрации цАМФ) увеличивает и активность фосфодиэстеразы. При определенной концентрации цАМФ достигается такая активность фосфодиэстеразы, которая равна активности аденилатциклазы, стимулированной гормоном. Это позволяет клетке поддерживать концентрацию цАМФ на новом, повышенном уровне (фаза плато). Во

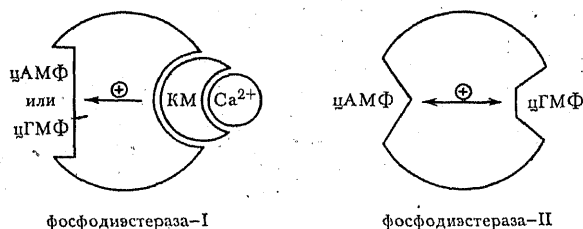


Рис. 72. Две формы фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов: Ca^{2+} -активируемая (чувствительная к кальмодулину) — фосфодиэстераза-I и циклонуклеотидактивируемая — фосфодиэстераза-II. Стрелками указаны регуляторные влияния

многих тканях цАМФ через реакции фосфорилирования вызывает повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Ионы Ca^{2+} активируют фосфодиэстеразу (см. ниже), в результате чего скорость гидролиза становится большей, чем скорость синтеза, и концентрация цАМФ снижается к исходному уровню. Так гасится регуляторный сигнал гормона, несмотря на то, что гормон присутствует в среде, а синтез цАМФ идет с повышенной скоростью.

В одной и той же ткани можно обнаружить несколько разных форм фосфодиэстеразы, различающихся по сродству к субстратам, молекулярному весу, заряду, регуляторным свойствам, субклеточной локализации. Неизвестно, детерминированы ли эти различия генетически или же они возникают за счет посттрансляционной модификации белков. Поэтому мы будем говорить о разных формах фосфодиэстеразы, а не о разных изоферментах. В настоящее время идентифицированы и выделены две основные формы фосфодиэстеразы (рис. 72), доля которых в общей фосфодиэстеразной активности клетки составляет 70—90%. Одна из

этих форм (ФДЭ-II) называется циклонуклеотидакти-
вируемой фосфодиэстеразой. Она способна гидролизо-
вать как цАМФ, так и цГМФ. При этом под действи-
ем цГМФ ускоряется гидролиз цАМФ, а под действием
цАМФ ускоряется гидролиз цГМФ. Столь необычные
свойства фермента могут объясняться либо положи-
тельно кооперативным взаимодействием двух активных

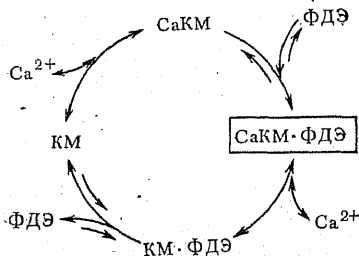


Рис. 73. Схема регуляции фос-
фодиэстеразы (ФДЭ) кальмо-
дулином (КМ) и ионами Ca^{2+}

фосфодиэстеразы, в результате чего будет снижаться
концентрация цАМФ в клетке.

В большинстве тканей животных функционирует
форма фосфодиэстеразы, которая непосредственно ак-
тивируется Ca^{2+} (см. рис. 66). В настоящее время эта
форма (ФДЭ-I) очищена от гомогенного состояния. По-
казано, что она существует преимущественно в виде
димера, построенного из двух идентичных субъединиц,
молекулярный вес которых равен 57 000. При повыше-
нии концентрации Ca^{2+} в цитоплазме к ферменту при-
соединяются две молекулы кальмодулина — Ca-связы-
вающего белка, имеющего молекулярный вес 18 500.
После образования такого комплекса активность фос-
фодиэстеразы возрастает в 6—10 раз. Снижение кон-
центрации Ca^{2+} в цитоплазме приводит к его отщепле-
нию от кальмодулина, и активный белок-белковый ком-
плекс распадается (рис. 73). Регуляция активности фос-
фодиэстеразы ионами Ca^{2+} — быстрый и обратимый
процесс.

Итак, при повышении концентрации цАМФ в клетке
может происходить фосфорилирование мембран или
других структур, в результате чего в цитоплазме воз-
растает концентрация Ca^{2+} . Связываясь с кальмодули-

ном, Ca^{2+} вызывает активацию Са-чувствительной формы фосфодиэстеразы. Действуя на гуанилатциклазу, он повышает концентрацию цГМФ — нуклеотида, который ускоряет гидролиз цАМФ циклонуклеотидактивируемой формой фосфодиэстеразы (рис. 74).

В результате активации обеих форм фермента происходит быстрое снижение концентрации цАМФ до исходного уровня. Через этот механизм концентрация

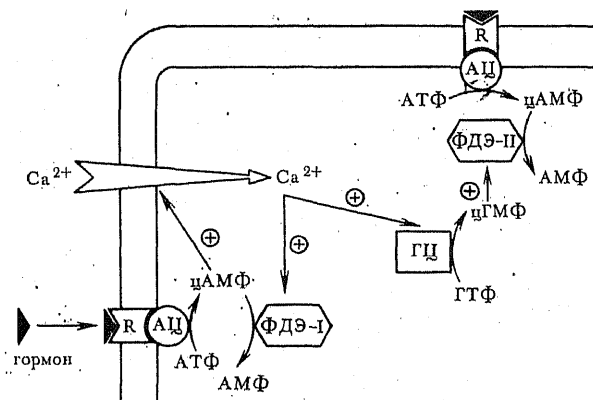


Рис. 74. Возможные пути влияния ионов Ca^{2+} на гидролиз цАМФ в клетке. АЦ и ГЦ — соответственно аденилатциклаза и гуанилатциклаза, остальные обозначения, как на рис. 72

цАМФ может быть снижена и другими агентами, повышающими проницаемость мембран для Ca^{2+} , например ацетилхолином (см. рис. 18) или α -адренергическими агентами. Ацетилхолин и α -адренергические агенты могут снижать содержание цАМФ через дополнительный механизм, ингибируя аденилатциклазу (см. раздел. 4.2.1).

При длительной (несколько часов или дней) стимуляции синтеза цАМФ происходит активация фосфодиэстеразы путем индукции ее синтеза. На миоблестах и клетках глиомы показано, что длительное воздействие катехоламинов приводит к повышению активности фосфодиэстеразы и этот эффект блокируется ингибиторами транскрипции. Предполагается, что при индукции синтеза фосфодиэстеразы цАМФ-зависимые протеинкиназы переходят в ядро, так как катехоламины снижают содержание протеинкиназ в цитоплазме и повыша-

ют в ядре. Процесс транслокации протеинкиназ в ядро может быть связан с функционированием микротрубочек. Винбластин и колхицин, разрушающие микротрубочки, подавляют цАМФ-зависимое повышение содержания фосфодиэстеразы в цитоплазме и протеинкиназ — в ядре.

Под действием цАМФ индуцируется образование формы фосфодиэстеразы, нечувствительной к Ca^{2+} . Однако не исключено, что длительное повышение концентрации цАМФ в клетке сказывается и на молекулярной активности Ca^{2+} -чувствительной формы фосфодиэстеразы. Мы видели (см. рис. 73), что это происходит прежде всего за счет повышения концентрации Ca^{2+} . Показано также, что эта форма фермента может подвергаться цАМФ-зависимому фосфорилированию, биологический эффект которого пока не установлен. Наконец, цАМФ-зависимое фосфорилирование приводит к выходу кальмодулина из мембран в цитоплазму. Поскольку кальмодулин может взаимодействовать со многими ферментами клетки (см. раздел 5.1), нельзя исключить того, что между ними существует конкуренция за этот регуляторный белок. Поэтому повышение содержания кальмодулина в цитоплазме может способствовать более полной активации Ca^{2+} -чувствительной формы фосфодиэстеразы.

Регуляция активности фосфодиэстераз, по-видимому, не ограничивается действием циклических нуклеотидов и ионов Ca^{2+} . Обнаружено активирующее влияние на этот фермент поликатионов, лизоформ фосфолипидов, жирных кислот, ограниченного протеолиза. В сетчатке глаза фосфодиэстераза функционирует в комплексе с ГТФ-связывающим белком, подобным *N*-белку, который регулирует аденилатциклазу (см. раздел 4.2.1). При попадании кванта света на родопсин облегчается обмен ГДФ на ГТФ в нуклеотидсвязывающем центре этого белка, в результате чего фосфодиэстераза значительно активируется.

Под действием регуляторов соотношение скоростей гидролиза цАМФ и цГМФ может изменяться. Применение таких фармакологических агентов, как теофиллин, кофеин, теобромин, папаверин, НОШПА, трентал и т. п., обычно подавляет гидролиз обоих циклических нуклеотидов. Направленное изменение концентрации одного из циклических нуклеотидов (например, путем ак-

тивации аденилатциклазы) может повлечь за собой изменение содержания и другого циклического нуклеотида. Решающую роль в этом играет взаимосвязь между гидролизом цАМФ и цГМФ, а также ионы Ca^{2+} , регулирующие образование и распад циклических нуклеотидов. Поскольку в большинстве случаев цГМФ и цАМФ оказывают противоположное влияние на тот или иной биологический процесс, данное явление может способствовать «гашению» регуляторного сигнала, возвращению биологической системы в состояние «покоя».

4.2.3.

ПРОТЕИНКИНАЗЫ

Протеинкиназы принято классифицировать по белковым субстратам, фосфорилирование которых они катализируют. Свойства протеинкиназ, фосфорилирующих кислые (например, казеин) и щелочные (например, гистон H1) белки, существенно разные. Удобна также классификация протеинкиназ по аминокислотным последовательностям, которые они «узнают» на белке-субстрате. При этом также удается объединить в одну группу ферменты со сходными физико-химическими и каталитическими свойствами. Подразделение протеинкиназ на растворимые и связанные с мембранами представляется целесообразным и удобным, однако после обработки мембран растворами высокой ионной силы или детергентами можно солюбилизировать протеинкиназу, по всем критериям идентичную «растворимой». Не исключено, что некоторые протеинкиназы образуют в клетке непрочную, обратимую связь с мембраной и существует динамическое равновесие между свободной и связанной формой одного и того же фермента.

Большинство протеинкиназ клетки — регуляторные ферменты. Рассмотренная выше классификация в большей степени касается свойств активного центра или каталитической субъединицы, в составе которой он функционирует. Весьма удобна классификация протеинкиназ по их регуляторным свойствам. Эта классификация указывает на возможную физиологическую роль протеинкиназ (например, стимуляция циклическим АМФ свидетельствует об участии фермента в реализации гормональной регуляции), а также отражает каталитические свойства фермента, поскольку определенные

регуляторы стимулируют фосфорилирование определенного класса белков (например, для протеинкиназ, зависящих от циклических нуклеотидов, кислые белки служат плохими субстратами).

Рассмотрим свойства протеинкиназ, стимулируемых α АМФ и α ГМФ. Оба типа этих протеинкиназ (рис. 75) являются АТФ-фосфотрансферазами, связывают два (по последним данным — четыре) эквивалента цикли-

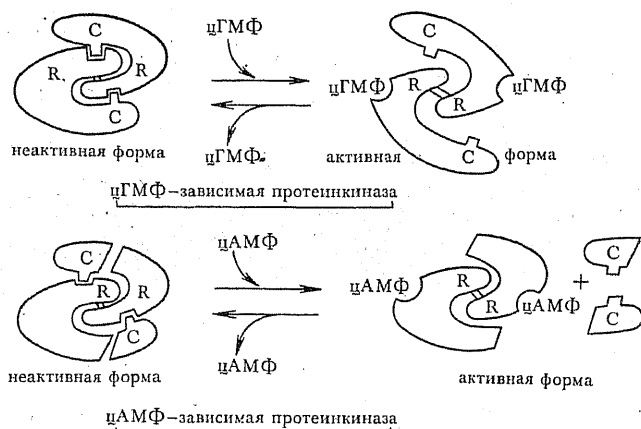


Рис. 75. Модели регуляции активности α АМФ- и α ГМФ-зависимых протеинкиназ циклическими нуклеотидами: Р — регуляторный, С — каталитический участок молекулы белка

ческого нуклеотида, имеют одинаковый молекулярный вес и даже одинаковую молекулярную асимметрию. Сходство α АМФ- и α ГМФ-протеинкиназ проявляется также в том, что они могут фосфорилировать одни и те же субстраты (например, гистон *H1*), причем «узнают» на молекуле белка сходные аминокислотные последовательности. Следует, однако, оговориться, что в клетке эти протеинкиназы фосфорилируют чаще всего разные субстраты, что, по-видимому, объясняется их разной компартиментализацией.

На основании сходства аминокислотного состава и некоторого совпадения первичных структур предполагается, что α АМФ- и α ГМФ-протеинкиназы произошли от общего предшественника. Принципиальное различие этих протеинкиназ заключается в том, что у α АМФ-за-

висимой протеинкиназы регуляторный и каталитический центры расположены на разных субъединицах, а у цГМФ-протеинкиназы на одной субъединице имеются два домена — активный центр и участок связывания цГМФ. Предполагается, что цГМФ-протеинкиназа является димером, построенным из двух идентичных протомеров, расположенных антипараллельно. Такая же структура предложена для цАМФ-протеинкиназы, однако у нее каждый протомер состоит из двух разных субъединиц — каталитической и регуляторной (см. рис. 75).

Холофермент цАМФ-протеинкиназы имеет молекулярный вес 152 000—174 000. При связывании цАМФ происходит диссоциация холофермента на регуляторный димер (каждая из субъединиц с молекулярным весом 42 000—55 000) и две каталитические субъединицы (молекулярный вес 38 000—42 000). Холофермент не обладает каталитической активностью. После отщепления от регуляторной субъединицы, оказывающей ингибирующее влияние, каталитическая субъединица приобретает фосфотрансферазную активность.

Протеинкиназы, зависящие от цАМФ, подразделяются на два типа. У первого типа цАМФ-протеинкиназ связь субъединиц менее прочная — ее удастся разрушить с помощью щелочных белков или высокой ионной силой (0,5 М NaCl). Эта форма фермента не обладает способностью к аутофосфорилированию.

При инкубации второй формы протеинкиназы с АТФ происходит включение двух молекул фосфора в регуляторный димер. Аутофосфорилирование облегчает диссоциацию холофермента, происходящую под действием цАМФ. По данным Кребса, после фосфорилирования регуляторных субъединиц диссоциацию холофермента вызывают в 5—6 раз меньшие концентрации цАМФ. Когда внешний сигнал, действующий на клеточные рецепторы, исчезает, содержание цАМФ в клетке понижается до исходного уровня, молекулы цАМФ диссоциируют от регуляторной (ингибиторной) субъединицы, вследствие чего она вновь связывается с каталитической субъединицей и фосфотрансферазная активность протеинкиназ снижается. При этом у второй формы фермента реассоциация происходит быстрее, чем у первой.

Регуляторная субъединица первого типа RI имеет

меньший молекулярный вес (49 000), чем субъединица второго типа RII (55 000), однако ограниченный протеолиз не приводит к переходу RII в RI. Опыты по «гибридизации» каталитической субъединицы с разными регуляторными белками показали, что образование первого или второго типа фермента полностью определяется свойствами регуляторной субъединицы и не зависит от каталитических субъединиц.

Каталитические субъединицы у разных цАМФ-протеинкиназ не идентичны. Они различаются прежде всего специфичностью в отношении белковых субстратов. Определенные различия существуют и в физико-химических свойствах. В одной и той же ткани методами изоэлектрофокусировки можно обнаружить две—три формы каталитической субъединицы.

Протеинкиназа, зависящая от цГМФ, не способна к аутофосфорилированию. Связывание цГМФ не вызывает ее диссоциации на протомеры, но переводит из неактивного состояния в активное (см. рис. 75). При электрофорезе в присутствии додецилсульфата она имеет молекулярный вес 150 000. Если же электрофорез проводят в присутствии додецилсульфата и агентов, восстанавливающих S—S-связи (например, 2-меркаптоэтанола), она приобретает молекулярный вес, равный 74 000. На основании этого считают, что два одинаковых протомера цГМФ-протеинкиназы соединены между собой сульфгидрильными связями. При удалении из среды цГМФ протеинкиназа переходит в неактивное состояние. Скорость этого перехода зависит только от константы скорости диссоциации цГМФ из регуляторного центра, поэтому при понижении в клетке концентрации циклических нуклеотидов цГМФ-протеинкиназа инактивируется гораздо быстрее, чем цАМФ-протеинкиназа, снижение активности которой зависит не только от скорости диссоциации нуклеотида, но и от скорости реассоциации субъединиц.

Следует отметить, что цАМФ является конкурентным ингибитором связывания цГМФ в регуляторном центре цГМФ-протеинкиназы. Точно так же и цГМФ препятствует связыванию цАМФ с регуляторной субъединицей цАМФ-протеинкиназы. Эта конкуренция не может влиять на функционирование протеинкиназ, так как связывание «чужого» циклического нуклеотида вызывает такой же активирующий эффект, как и связы-

вание «своего». Оба фермента высокоспецифичны в отношении своих активаторов, поэтому при физиологических изменениях концентрации одного из циклических нуклеотидов может изменяться активность только соответствующей протеинкиназы.

Протеинкиназы обладают большим сродством к циклическим нуклеотидам. Их константы активации равны $(2-5) \cdot 10^{-8}$ М. Однако концентрации этих ферментов в клетке составляют $10^{-7}-10^{-6}$ М. Поэтому для их насыщения нужны и соответствующие, более высокие концентрации циклических нуклеотидов. Кроме того, на связывание циклических нуклеотидов с протеинкиназами влияют многие внутриклеточные факторы. Так, например, при связывании MgATФ с активным центром первого типа цАМФ-протеинкиназы сродство регуляторной субъединицы к цАМФ снижается в 10 раз. Во многих тканях обнаружены белковые ингибиторы протеинкиназ, действующие как на каталитические, так и на регуляторные субъединицы, что также сказывается на зависимости фосфотрансферазной активности от концентрации циклических нуклеотидов. По мнению Кребса, цАМФ и цГМФ при концентрациях, которые свойственны покоящейся клетке, не обеспечивают даже слабой активности цАМФ- и цГМФ-зависимых протеинкиназ. В то же время, эти концентрации цАМФ и цГМФ близки к пороговым. Достаточно увеличить их на 20—30%, как начинается активация протеинкиназ. Связывание циклических нуклеотидов кооперативно (коэффициент Хилла равен 2), поэтому малые изменения концентрации эффектора приводят к существенным изменениям активности протеинкиназ. Показано, что в скелетной мышце увеличение концентрации цАМФ всего в 4—5 раз приводит к практически полной активации цАМФ-зависимой протеинкиназы.

По данным Е. С. Северина, фосфотрансферазная реакция, катализируемая цАМФ-протеинкиназой, протекает через стадию образования фосфогистидина в активном центре фермента. Миграция фосфата с фермента на ОН-группу серила или треонила белкового субстрата завершает эту реакцию, и фосфорилированный субстрат покидает активный центр. Протеинкиназы не имеют абсолютной субстратной специфичности: в модельных опытах они могут фосфорилировать и посторонние, несвойственные им субстраты, однако скорость

такого фосфорилирования обычно в несколько раз или в несколько десятков раз ниже:

Существует класс протеинкиназ, регулируемых ионами Ca^{2+} . Рассмотрим регуляцию этих протеинкиназ на примере киназы фосфоорилазы. Эта киназа — субстрат цАМФ-зависимой протеинкиназы. Она опосредует регуляцию гликогенолиза гормонами. Принимая сигнал от цАМФ-протеинкиназы, она передает его на фосфоорила-

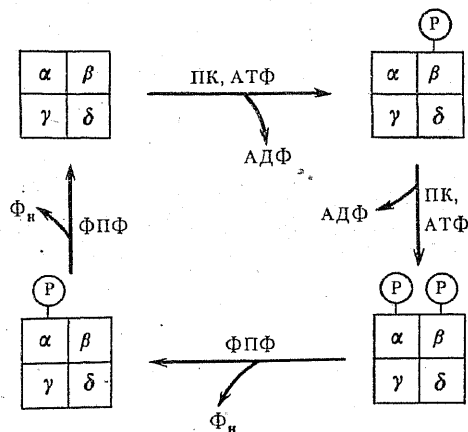


Рис. 76. Регуляция активности киназы фосфоорилазы путем цАМФ-зависимого фосфорилирования. ПК — протеинкиназа, ФПФ — фосфопротеинфосфатаза, α, β, γ, δ — субъединицы, входящие в состав одного протомера киназы фосфоорилазы, Р — неорганический фосфат (P_i), ковалентно присоединенный к белку.

зу (см. рис. 16). Протомер киназы фосфоорилазы состоит из четырех субъединиц: α, имеющий молекулярный вес 118 000—145 000, β — 108 000—130 000, γ — 41 000—45 000 и δ — 17 000—18 000 (рис. 76). Молекула киназы фосфоорилазы построена из четырех таких протомеров и имеет молекулярный вес 1 280 000. Функции каждой из субъединиц окончательно не ясны. Предполагается, что каталитической является β-субъединица.

При цАМФ-зависимом фосфорилировании включается 2 моля фосфата на 1 моль протомера: сначала одна молекула фосфата присоединяется к β-субъединице, при этом киназа фосфоорилазы активируется в 25—50 раз, а затем другая молекула фосфата присоеди-

ется к α -субъединице, в результате чего активируется в 100 раз дефосфорилирование β -субъединицы специфической фосфопротейнфосфатазой (см. рис. 76).

На примере киназы фосфорилазы мы видим, что протейнкиназы опосредованно, через изменение структуры субстрата, могут влиять на активность фосфатаз. Отметим, что циклические нуклеотиды также могут опосредованно влиять на активность фосфопротейнфосфатаз. Так, например, цАМФ ускоряет дефосфорилирование регуляторной субъединицы цАМФ-зависимой протейнкиназы. При этом действие цАМФ осуществляется не на фосфатазу, а на саму регуляторную субъединицу протейнкиназы: присоединяясь к ней и изменяя ее конформацию, нуклеотид делает ее хорошим субстратом фосфопротейнфосфатаз.

При использовании других фосфобелков можно обнаружить ингибирующее влияние цАМФ на дефосфорилирование. Известно также влияние цГМФ и Ca^{2+} на скорость дефосфорилирования белков. К сожалению, фосфопротейнфосфатазы недостаточно изучены. Их быстрая инактивация после выделения из клетки, склонность к агрегации и т. д. не позволяют определить, направлены ли эти регуляторные влияния на фермент или же на его белковый субстрат.

По данным Коэна, δ -субъединица, входящая в состав киназы фосфорилазы, является кальмодулином — регуляторным белком, который обеспечивает действие Ca^{2+} на фосфодиэстеразу (см. раздел 4.2.2). Благодаря наличию кальмодулина, киназа фосфорилазы представляет собой Са-активируемый фермент. В определенных условиях ионы Ca^{2+} могут вызывать самофосфорилирование фермента, приводящее, как и в случае фосфорилирования цАМФ-зависимыми протейнкиназами, к активации киназы фосфорилазы в десятки раз.

В отсутствие ионов Ca^{2+} киназа фосфорилазы не активна. Поэтому при низкой концентрации Ca^{2+} в цитоплазме гормональный сигнал мог бы гаситься, не достигая фосфорилазы. Это не происходит, так как после цАМФ-зависимого фосфорилирования значительно увеличивается сродство киназы фосфорилазы к ионам Ca^{2+} (рис. 77). После фосфорилирования для фермента оказывается достаточной та концентрация Ca^{2+} , которая есть в покоящейся клетке. Таким образом, для проведения гормонального сигнала от рецептора до фосфо-

риказы не обязательно «подкрепление» со стороны нервной системы, действующей на клетку путем повышения проницаемости мембран для Ca^{2+} . В свою очередь, и нервные стимулы, и гормоны, влияющие на компартментализацию Ca^{2+} , могут стимулировать гликогенолиз через киназу фосфорилазы, минуя реакции цАМФ-зависимого фосфорилирования. При повышении концентрации Ca^{2+} значительно ускоряется фосфорилирование фосфорилазы. Это происходит за счет аллосте-

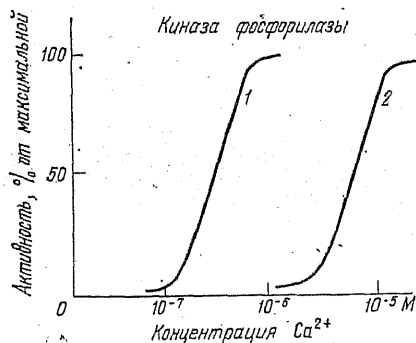


Рис. 77. Влияние цАМФ-зависимого фосфорилирования на сродство киназы фосфорилазы к ионам Ca^{2+} . Для сравнения зависимостей от концентрации Ca^{2+} максимальные активности обеих форм киназы фосфорилазы приняты за 100%. Максимальная каталитическая активность фосфорилированной формы в несколько раз выше, чем нефосфорилированной. 1 — фосфорилированная, 2 — нефосфорилированная киназа фосфорилазы

рической активации киназы фосфорилазы ионами Ca^{2+} . Дополнительная активация может достигаться путем Са-зависимого аутофосфорилирования киназы фосфорилазы. На этом сложном олигомерном ферменте сходятся два пути регуляции — нервный и гормональный.

Киназа фосфорилазы не единственная протеинкиназа, на примере которой можно проследить взаимодействие Са-зависимой и циклонуклеотидзависимой регуляции. Подобное взаимодействие наблюдается и для Са-зависимой протеинкиназы, фосфорилирующей легкие цепи миозина в гладкой мышце. Чувствительность к Ca^{2+} этой протеинкиназе, как и киназе фосфорилазы, придает кальмодулин. Однако в олигомерной структуре киназы фосфорилазы кальмодулин связан прочно и не отщепляется ни при каких физиологических условиях. Протеинкиназа легких цепей миозина, подобно фосфодиэстеразе (см. раздел 4.2.2), образует с кальмодулином диссоциирующий комплекс. Адельштайн и сотрудники показали, что эта протеинкиназа может подвергаться цАМФ-зависимому фосфорилированию и

такое фосфорилирование лишает фермент сродства к кальмодулину. В результате этого регуляторный белок отщепляется и протеинкиназа теряет чувствительность к активирующему действию Ca^{2+} . Благодаря этим данным стало понятно, в частности, почему цАМФ вызывает расслабление гладких мышц. Оказалось, что Са-зависимое фосфорилирование легких цепей миозина приводит к сокращению гладкой мышцы. При повышении концентрации цАМФ происходит фосфорилирование Са-протеинкиназы, отщепляется кальмодулин, что приводит к резкому снижению скорости включения фосфата в легкие цепи миозина. Фосфопротеинфосфатаза дефосфорилирует легкие цепи миозина, и поэтому мышца расслабляется.

Для киназы фосфорилазы цАМФ-зависимое фосфорилирование служит фактором, который усиливает Са-зависимую регуляцию, а для протеинкиназы легких цепей миозина — фактором, который блокирует эффекты Ca^{2+} . В ферментном каскаде, регулирующем распад гликогена, цАМФ-зависимое фосфорилирование имитирует повышение концентрации Ca^{2+} , а в каскаде, регулирующем сократительную активность гладких мышц, вызывает те же эффекты, что и снижение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме.

Отнюдь не все Са-зависимые протеинкиназы находятся под контролем реакций цАМФ- или цГМФ-зависимого фосфорилирования. Известны протеинкиназы, которые не подвергаются фосфорилированию и испытывают лишь регуляторное влияние ионов Ca^{2+} . В ряде случаев субстратами таких протеинкиназ служат те же белки, которые подвергаются цАМФ-зависимому фосфорилированию, однако участки фосфорилирования, узнаваемые на белках этими двумя типами протеинкиназ, как правило, разные. Это может обеспечивать значительное усиление ответа ткани на совместное действие гормонального и нервного стимула (рис. 78). Например, как цАМФ-зависимое, так и Са-зависимое фосфорилирование фосфоламбана (регуляторный белок мембран ретикулума) приводит к ускорению активного транспорта Ca^{2+} в цистерны саркоплазматического ретикулума сердца. Каждый из регуляторов обеспечивает включение в молекулу фосфоламбана одной молекулы неорганического фосфата. При одновременном повышении концентрации Ca^{2+} и цАМФ происходит вклю-

чение в фосфоламбан двух молекул фосфата, и тогда активный транспорт Ca^{2+} ускоряется значительно сильнее, чем под действием лишь одного из этих регуляторов.

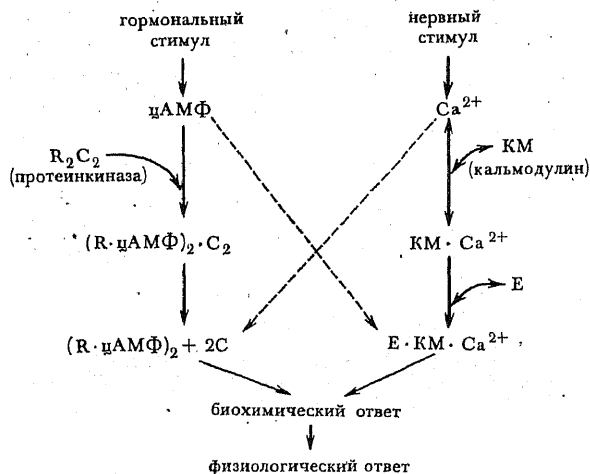


Рис. 78. Реализация гормонального и нервного регуляторных сигналов при участии цАМФ, Ca^{2+} , протеинкиназы и кальмодулина. Пунктирными линиями показано регуляторное влияние цАМФ на Ca^{2+} -зависимые ферменты (Е), а также влияние Ca^{2+} на цАМФ-зависимые ферменты

4.2.4.

ФЕРМЕНТНЫЙ КАСКАД

Передача сигнала от мембранного рецептора путем синтеза циклических нуклеотидов представляет собой каскадную систему усиления внеклеточного сигнала.

Рассмотрим этот каскад на примере активации гормонами гликогенолиза (см. рис. 16). Одна молекула гормона «включает» в работу одну или несколько молекул аденилатциклазы, в результате чего внутри клетки образуются тысячи молекул цАМФ. На этом этапе сигнал усиливается в 10^2 — 10^3 раз. Образующаяся цАМФ «включает» другой катализатор — протеинкиназу, усиливая при этом сигнал еще в 100 раз. Сигнал усиливается и при включении киназы фосфорилазы и самой фосфорилазы. Суммарное усиление сигнала равно 10^6 — 10^7 раз, т. е. по механизму каскадного усиления.

ния одна молекула регулятора потенциально способна привести к изменению состояния или структуры миллионов других молекул. Этот механизм регуляции может воздействовать (прямо или опосредованно) на многие метаболические процессы и клеточные функции. Без каскадного усиления сигнала ни гормоны, действующие при концентрации 10^{-10} — 10^{-7} М, ни Ca^{2+} и циклические нуклеотиды, концентрации которых в цито-

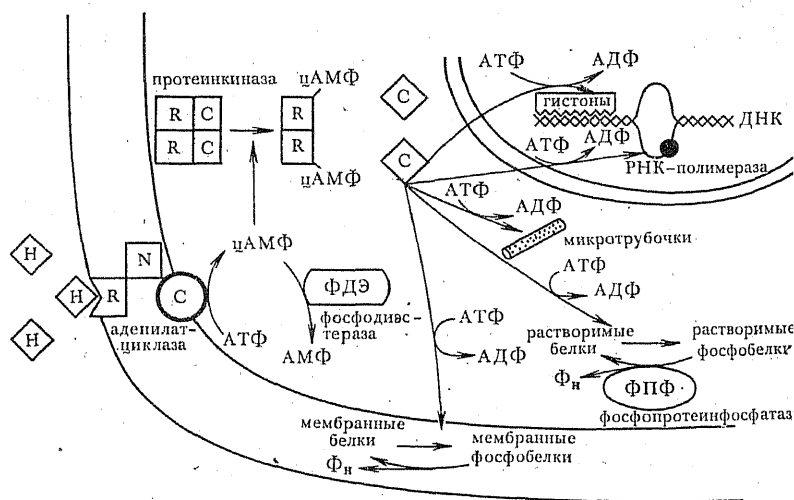


Рис. 79. Ферментный каскад с участием цАМФ, опосредующий влияние гормонов на клетку

плазме не превышают 10^{-6} М, не могли бы регулировать активность, например, такого фермента, как фосфорилаза, поскольку ее концентрация в клетке составляет 10^{-5} М.

В большинстве случаев в ферментном каскаде с участием цАМФ осуществляется двухэтапное усиление — через активацию аденилатциклазы и цАМФ-протеинкиназы (рис. 79). В случае регуляции гликогенолиза мы наблюдаем дополнительное усиление за счет последовательного подключения еще одной протеинкиназы — киназы фосфорилазы.

Действие ряда гормонов, простагландинов и нейромедиаторов на синтез цГМФ опосредуется входом Ca^{2+}

в клетку (см. рис. 18). Следовательно, в отличие от цАМФ, который является вторым посланником регуляторного сигнала (первый — гормон), цГМФ часто выступает в качестве третьего посланника в проведении регуляторного сигнала. Поэтому в цГМФ-зависимом ферментном каскаде может достигаться большая степень усиления.

Передача сигнала посредством рассматриваемого нами каскада сопровождается постоянным потреблением энергии на синтез циклических нуклеотидов и на фосфорилирование белков. Передача сигнала от рецептора на аденилатциклазу происходит при участии ГТФ (см. раздел 4.2.1), а активация цАМФ-зависимой протеинкиназы в ряде случаев протекает путем аутофосфорилирования (см. раздел 4.2.3). Следовательно, регуляция активности основных «усилителей» ферментного каскада также требует использования макроэргов.

Потребление в каскаде макроэргических соединений делает невозможным обращение цепи реакций или «смешивание» разных сигналов. Так, например, использование фосфодиэстеразой макроэргического субстрата цАМФ исключает возможность синтеза цАМФ из немacroэргического продукта АМФ, а следовательно, делает невозможным включение ферментного каскада внутриклеточными процессами, повышающими концентрацию АМФ.

Одна из причин эффективного усиления сигнала в данном ферментном каскаде заключается в градиенте концентрации ферментов, входящих в него. Содержание аденилатциклазы в тканях животных составляет, по-видимому, около одной миллионной от содержания остальных белков. Протеинкиназы, зависимые от цАМФ, удается получать в гомогенном виде путем очистки в несколько тысяч раз. Содержание киназы фосфорилазы может составлять около 1%, а фосфорилазы — около 4% от всех белков цитоплазмы. Учитывая, что цАМФ посредством протеинкиназы регулирует активность многих других ферментов помимо фосфорилазы (см. рис. 79), различие в концентрациях ферментов в начале и в конце каскада окажется еще большим.

Дополнительное усиление в ферментном каскаде может достигаться за счет одновременного, но противоположного по знаку влияния на синтез и деградацию вещества. Так, например, в одной и той же клетке

цАМФ ускоряет расщепление гликогена (активация фосфорилазы) и тормозит синтез гликогена (ингибирование гликогенсинтазы).

Данный каскад усиления имеет также системы, гасящие его. Это — фосфодиэстераза, гидролизующая циклические нуклеотиды, и фосфопротеинфосфатаза, дефосфорилирующая фосфобелки. Таким образом, ферментный каскад состоит из целого ряда ферментов, каждый из которых находится под метаболическим контролем — испытывает регуляторное воздействие внутриклеточных метаболитов, кофакторов и коферментов. Так осуществляется интеграция внутриклеточных и внеклеточных процессов, коррекция внутренними факторами внешних регуляторных воздействий. Последовательное участие в ферментном каскаде целого ряда ферментов делает регуляцию со стороны метаболитов и кофакторов более тонкой и множественной.

Каждый из этапов передачи сигнала в ферментном каскаде находится под контролем специальных защитных механизмов. Длительное действие гормона приводит к десенсибилизации мембранных рецепторов — они либо инактивируются, либо маскируются (см. раздел 3.4), в результате чего степень активации аденилатциклазы снижается. Если концентрация цАМФ в клетке длительное время повышена, может происходить фосфорилирование мембран, что приводит к повышению в цитоплазме концентрации Ca^{2+} . В результате этого ускоряется гидролиз цАМФ и образуется цГМФ (см. рис. 74), часто оказывающий эффекты, противоположные эффектам цАМФ.

Под действием цАМФ может индуцироваться синтез фосфодиэстеразы и белковых модуляторов протеинкиназ, снижающих сродство к цАМФ у регуляторных и подавляющих фосфотрансферазную активность каталитических субъединиц фермента. Защита от «перевозбуждения» наблюдается даже на уровне субстратов цАМФ-зависимого фосфорилирования. На примере киназы фосфорилазы мы видели, что после быстрого фосфорилирования β -субъединицы (при этом фосфорилировании фермент активируется) происходит медленное фосфорилирование α -субъединицы, что приводит к резкому ускорению дефосфорилирования β -субъединицы и возвращению фермента в исходное, малоактивное состояние (см. раздел 4.2.3). Точно так же и связывание

цАМФ с регуляторной субъединицей протеинкиназы сначала способствует диссоциации, но затем ускоряет их реассоциацию — возвращение в каталитически неактивное состояние, так как облегчает дефосфорилирование регуляторной субъединицы фосфопроteinфосфатазой.

Столь большое число защитных механизмов, которые мы находим в ферментном каскаде, по-видимому, связано с важной ролью этого регуляторного процесса, его высокой эффективностью, а также с тем, что через систему циклических нуклеотидов действуют главным образом те гормоны и гормоноподобные вещества, которые стимулируют катаболизм веществ в клетке. Если бы не срабатывали «механизмы защиты», то стимуляция синтеза цАМФ адреналином могла бы вызвать полное расщепление гликогена скелетных мышц всего за несколько минут. Так же быстро организм лишился бы жировых запасов. Быстрое сжигание энергетических ресурсов сопровождалось бы резким перегревом, многими другими явлениями, приводящими к тяжелым функциональным расстройствам.

Фосфорилирование белков, в котором участвуют циклические нуклеотиды, является не менее важным и не менее распространенным регуляторным процессом, чем такие механизмы регуляции, как изменение проницаемости мембран (см. раздел 4.1) или индукция — репрессия синтеза белков (см. раздел 4.3). В то же время, среди способов химической модификации фосфорилирование — лишь один из путей регуляции функциональной активности белка, протекающий наряду с метилированием, аденилированием, АДФ-рибозилированием, ацетилированием и процессингом белков (см. раздел 1.3). Как мы видели, среди реакций фосфорилирования циклические нуклеотиды — весьма важные, но не единственные регуляторы.

Ферментный каскад, в котором участвуют циклические нуклеотиды, не уникален и как система усиления регуляторного сигнала. Так, например, активация протромбина протекает через ферментный каскад (система свертывания крови), в котором участвует не 2—3 усилителя сигнала, а более 5. Соответственно, и степень усиления регуляторного сигнала в этом случае достигается большая.

Из всех способов химической модификации белков

(см. раздел 1.3) мы подробно рассмотрели только процессы фосфорилирования, в которых участвуют циклические нуклеотиды. Это объясняется не «центральной ролью» этих регуляторов, а уровнем современных знаний о молекулярных механизмах действия разных регуляторов. К сожалению, роль в нейроэндокринной регуляции таких способов модификации белков, как метилирование, аденилирование, ацетилирование и т. д., пока не достаточно ясна. Многие регуляторные процессы остаются «в тени» не потому, что они менее важны, а потому, что знания об их роли и молекулярных механизмах проявления недостаточно полны.

4.3.

ГОРМОНЗАВИСИМАЯ ИНДУКЦИЯ И РЕПРЕССИЯ СИНТЕЗА БЕЛКА

Интенсивность белкового синтеза зависит от большого количества факторов: функционального состояния генома, наличия энергетического и пластического материала, количества рибосом и состояния мембран эндоплазматического ретикулума, активности ферментов, осуществляющих процессинг и разрушение нуклеиновых кислот и т. д. В силу этого интенсивность метаболизма разных веществ (например, сахаров, которые служат источником энергии и поставляют пентозу, нужную для синтеза нуклеиновых кислот) может сказываться на скорости синтеза белка.

Многие метаболиты и ионы регулируют скорость белкового синтеза, поэтому гормоны и нейромедиаторы, изменяющие проницаемость мембран для этих веществ (см. раздел 1.2), опосредованно могут влиять и на синтез белка. Такие же эффекты можно наблюдать при действии на клетку гормонов и нейромедиаторов, стимулирующих фосфорилирование белков (см. раздел 1.3). Поскольку при фосфорилировании изменяется интенсивность многих метаболических процессов (гликогенолиз, липолиз и т. д.), опосредованно это может затрагивать и системы синтеза белка. Кроме того, фосфорилированию подвергаются белки хроматина (гистоны, сигма-фактор РНК-полимеразы) и рибосомальные белки (например, белок 6S, см. раздел 4.1), поэтому стимуляторы процессов фосфорилирования могут и непосредственно воздействовать на транскрипцию и

трансляцию белков. Однако все эти эффекты оказываются «неспецифичными» — ускоряется или замедляется, как правило, общий белковый синтез. Наиболее интересна, а для клетки, по-видимому, наиболее важна специфическая индукция и репрессия синтеза белка, т. е. изменение концентрации лишь одного или нескольких белков при неизменной концентрации всех остальных. Такую регуляцию осуществляют стероидные и тиреоидные гормоны.

Мембраны животных клеток не препятствуют проникновению молекул стероидов, поэтому эти гормоны могут входить внутрь как клеток-мишеней, так и клеток, не являющихся объектом их биологического действия. Однако концентрироваться, накапливаться в концентрациях, больших, чем в крови, стероидные гормоны могут только в клетках-мишенях. Кроме того, в тканях-«немишенях» наблюдается быстрый как вход, так и выход стероидов. В клетках-мишенях молекула стероидного гормона задерживается надолго — на десятки минут или даже часов. Эти различия объясняются тем, что в цитоплазме клеток-мишеней есть рецепторы стероидов, которые связывают молекулу гормона.

Рецепторы стероидных гормонов — это гидрофильные олигомерные белки с молекулярным весом 200 000—300 000. При повышении ионной силы раствора до 0,3 М NaCl рецепторы диссоциируют на белки с молекулярным весом 60 000—120 000. При этом гормонсвязывающие свойства рецепторов не изменяются. Константа сродства рецепторов к стероидным гормонам равна 10^8 — 10^{10} М⁻¹. Концентрация рецепторов в тканях-мишенях составляет около 10^{-10} — 10^{-9} М, а количество — 5—40 тыс. молекул на клетку.

Для того чтобы получить рецепторы стероидных гормонов в гомогенном виде, нужна их очистка в 10 000 раз (напомним, что для мембранных рецепторов — более чем в 100 000 раз, см. раздел 3.3). Некоторые из этих рецепторов уже получены в чистом виде. Показано, что они представляют собой асимметричные белковые молекулы, построенные из полипептидных цепей с молекулярным весом от 12 000 до 60 000. На свойства рецепторов не влияют нуклеазы, липазы и нейраминидазы. Рецепторы, по-видимому, не обладают ферментативными активностями. Путем протеолиза молекулярный вес рецепторов можно снизить в 10 раз.

Гормонсвязывающие свойства рецепторов при этом не нарушаются, однако утрачивается их способность взаимодействовать с компонентами ядра и осуществлять биологические эффекты гормона (рис. 80).

Для проявления эффекта стероидного гормона необходимо, чтобы гормон-рецепторный комплекс, образовавшийся в цитоплазме, проник в ядро (рис. 81). Этому процессу предшествует так называемая актива-

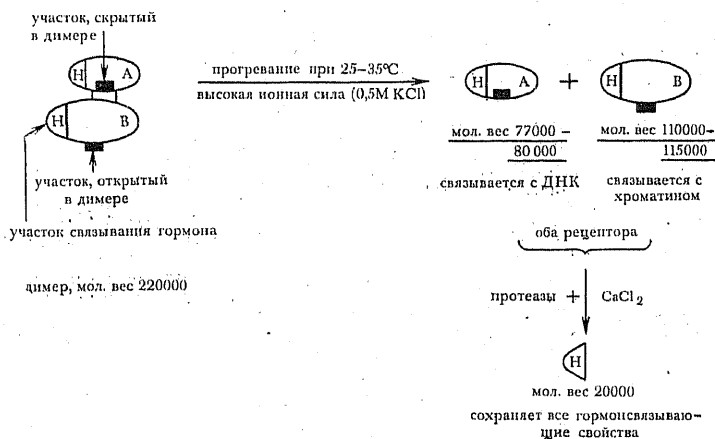


Рис. 80. Структура рецептора прогестинов, состоящего из субъединиц А и В

ция рецепторов — реакция, не требующая энергии или участия ферментов. Активировать можно только гормон-рецепторный комплекс (а не свободный рецептор). Для этого достаточно его прогреть до 25°C или же подвергнуть диализу. Активация рецепторов, видимо, заключается в удалении из гормон-рецепторного комплекса низкомолекулярного ингибитора, препятствующего транслокации белка в ядро.

Активированный гормон-рецепторный комплекс приобретает сродство к полианионам, поэтому может связываться с ДНК. Существует предположение, что в цитоплазме рецептор компартментализован, т. е. имеет ограниченную подвижность, поэтому не может проникать в ядро. Действительно, в отсутствие гормона цитоплазматический рецептор никогда не проникает в ядро. Пройдя через стадию образования гормон-рецеп-

торного комплекса, а затем активации, рецептор претерпевает структурные и конформационные изменения (например, изменяется константа седиментации белка), в результате которых становится возможным его свободное движение в клетке, а следовательно, и проникновение в ядро. Транслокация — это энергонезависимый процесс, происходящий без участия микротрубо-

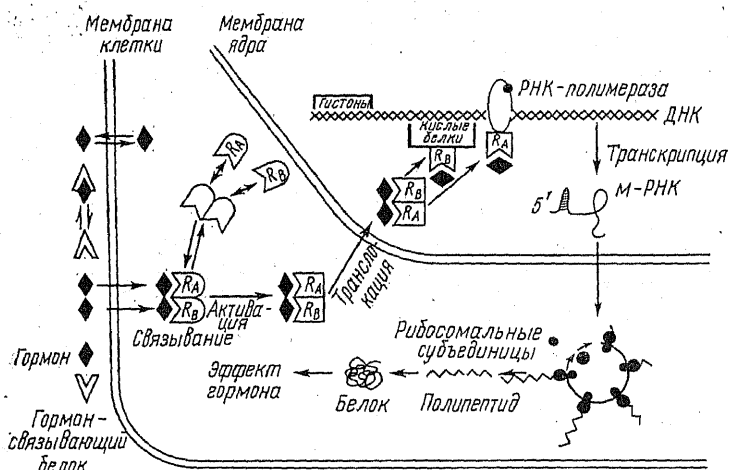


Рис. 81. Процессы, приводящие к влиянию стероидных гормонов на синтез белка

чек и микрофиламентов или других структур, осуществляющих направленное движение белков.

Проникнув в ядро, гормон-рецепторный комплекс связывается как с ДНК, так и с белками хроматина. По-видимому, у рецептора есть специфические участки узнавания ДНК. Во всяком случае, ингибиторы ДНК- и РНК-полимераз, действующие путем блокирования связывания этих ферментов с ДНК, препятствуют также взаимодействию рецепторов с ДНК.

Связывание гормон-рецепторных комплексов с ДНК не имеет ни видовой, ни тканевой специфичности. Более того, оно почти одинаково хорошо происходит как с нативной, так и с денатурированной ДНК, а также с ДНК, выделенной из бактерий и фагов, которые, конечно же, не регулируются стероидными гормонами. Вероятно, решающую роль в этом процессе играет

электростатическое взаимодействие между положительно заряженными группами белка и отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК.

Для рецепторов прогестинов показано, что с ДНК связывается субъединица *A* рецептора. Субъединица *B* обладает высоким сродством к белкам хроматина (см. рис. 81). Наиболее эффективное связывание (константа сродства 10^{10} M^{-1}) наблюдается между субъединицей *B* и кислыми белками хроматина. Интересно, что гормон-рецепторный комплекс имеет большее сродство к активному, чем к неактивному хроматину. Вычленив связывание с эухроматином крайне сложно, так как активный хроматин составляет небольшую долю от всех участков связывания рецепторов в ядре. По-видимому, мест связывания в ядре много больше, чем рецепторов в клетке, так как никогда не удастся достичь насыщения рецепторами всех участков связывания в ДНК и хроматине. Неизвестно, какие из этих участков связывания участвуют в реализации биологического эффекта стероидных гормонов. Обычно между биологическим эффектом и количеством гормон-рецепторных комплексов, связавшихся в ядре, наблюдается прямо пропорциональная зависимость.

Индукция или репрессия синтеза белка происходит лишь спустя 1—2 ч после проникновения в клетку стероидного гормона. Этот лаг-период объясняется медленным протеканием процессов, начинающихся после связывания гормон-рецепторного комплекса в ядре. Основной причиной влияния стероидов на белковый синтез является индукция образования мРНК. В ряде случаев стероиды стимулируют в одной клетке образование 100—150 тыс. молекул мРНК, в которой закодирована структура лишь 1—3 белков. В дальнейшем синтез этих белков оказывается прямо пропорциональным концентрации образовавшейся мРНК. Существуют убедительные данные в пользу того, что стероидные гормоны не только стимулируют транскрипцию определенных структурных генов (собственно синтез про-мРНК), но также ускоряют процессинг, транспорт из ядра в цитоплазму и тормозят деградацию этой нуклеиновой кислоты.

Усиление транскрипции мРНК происходит, по-видимому, потому, что в течение первых 30 мин после попадания в клетку стероидные гормоны увеличивают в

1,5—2,0 раза число точек инициации — мест связывания РНК-полимеразы на ДНК. Учитывая, что в одной клетке стероид влияет на синтез не более 5—7 белков, трудно объяснить, почему для индукции соответствующих мРНК стероидный гормон вызывает появление в клетке 500 тыс. новых точек инициации транскрипции.

Благодаря тому, что число мест связывания для РНК-полимеразы возросло, в первые 15—30 мин наблюдается активация этого фермента. Спустя 1,0—1,5 ч активность РНК-полимеразы II снижается, а затем через 6—10 ч вновь возрастает. Вторая фаза повышения активности фермента связана, вероятно, с его дополнительным синтезом, так как она блокируется пуromицином.

В первые же 30 мин после появления в клетке гормона происходит активация РНК-полимеразы I, которая осуществляет в ядрышке синтез рРНК. Благодаря увеличению количества рРНК, образуется дополнительное количество рибосом, которые связываются с мембранами эндоплазматического ретикулума и образуют полисомы. Вследствие согласованного действия стероидов на синтез мРНК и рРНК через 2—3 ч после гормональной стимуляции наблюдается усиленный синтез индуцируемых белков.

Репрессия синтеза белка происходит, по-видимому, путем подавления синтеза соответствующей про-мРНК. Так, например, показано, что глюкокортикоиды ингибируют синтез АКТГ в гипофизе, подавляя образование мРНК для белка-предшественника АКТГ. В этой же ткани глюкокортикоиды индуцируют синтез гормона роста, но репрессируют синтез пролактина.

Под контролем стероидных гормонов находится также синтез белковых ингибиторов и активаторов, а также регуляторных субъединиц ряда ферментов. Репрессия синтеза белкового ингибитора может приводить к повышению, а индукция синтеза — к снижению активности фермента, регулируемого этим белком.

В течение первых 5—20 мин после попадания в клетку гормона большая часть рецепторов переходит (в комплексе с гормоном) в ядро. Спустя 1—3 ч рецепторы в ядре начинают «исчезать». В ряде случаев количество гормон-рецепторных комплексов в ядре через 3—10 ч снижается в 2—4 раза, при этом они не выявляются в цитоплазме — концентрация цитоплаз-

матических рецепторов в течение всего этого времени остаётся на постоянном уровне. Лишь спустя 10—12 ч в цитоплазме начинается увеличиваться концентрация стероидных рецепторов, которая постепенно достигает исходного уровня.

Показано, что восстановление концентрации рецепторов в цитоплазме происходит как путем «демаскировки» (восстановление способности связывать гормон), так и (большей частью) путем нового дополнительного синтеза рецепторов. Предполагается, что снижение концентрации рецепторов в ядре, которое наблюдается через 1—3 ч после поступления гормона в клетку, имеет отношение к терминации гормонального эффекта.

Спустя 10—12 ч после инъекции глюкокортикоидов активность тирозинаминотрансферазы в печени может повышаться в 5—10 раз. Если же гепатоциты отмываются от глюкокортикоидов, активность фермента постепенно возвращается к исходному уровню. Актиномицин D — ингибитор синтеза мРНК — не только подавляет индукцию синтеза тирозинаминотрансферазы, но и препятствует снижению ее уровня после удаления стероидного гормона. Предполагается, что в регуляции синтеза и распада фермента участвуют два гена — структурный и регуляторный. На структурном гене происходит синтез мРНК, при трансляции которой образуется фермент. На регуляторном гене синтезируется мРНК, запускающая синтез репрессора. Репрессор подавляет трансляцию (но не транскрипцию) мРНК фермента, а также стимулирует распад этой нуклеиновой кислоты. Рецепторы глюкокортикоидов, по-видимому, могут индуцировать синтез мРНК фермента, а также связываться с репрессором и тем самым вызывать его инактивацию. Таким образом осуществляется влияние стероидного гормона не только на синтез, но и на стабильность мРНК. Характерно, что индукция может происходить лишь на определенных стадиях клеточного цикла (G_1 - и S-фазы). За несколько часов до митоза и спустя несколько часов после митоза тирозинаминотрансфераза становится «неиндуцибельной». Поскольку деление клеток в ткани происходит, как правило, асинхронно, влияние стероидных гормонов будет проявляться лишь на части клеточной популяции. Следует отметить также, что в одной и той же ткани могут присутствовать клеточные популяции, разнородные и в от-

ношении морфологии, и в отношении ферментного состава, и в отношении наличия рецепторов к тем или иным стероидным гормонам. Вследствие этого чувствительность к определенному стероиду проявляют, как правило, далеко не все клетки в ткани-мишени.

Вероятно, существует неоднородность рецепторов для стероида и в одной и той же клетке. Этим можно объяснить способность определенного гормона вызывать в клетке несколько разных эффектов — индукцию одних и репрессию других белков.

Первичными процессами в действии стероидных гормонов является синтез мРНК, рРНК и белков. Затем происходит образование полирибосом, синтез мембранных компонентов (фосфолипидов и белков) и полиаминов. После этого могут развиваться так называемые поздние эффекты. Они наиболее характерны для половых стероидов, оказывающих анаболическое влияние. При этом происходит синтез гистонов, активация ферментов редупликации ДНК (тимидинкиназы, «расплетазы», ДНК-полимеразы). При продолжительной гормональной стимуляции активируется деление клеток.

Рецепторы стероидов в комплексе с гормоном могут связываться с рибосомами и мембранами эндоплазматического ретикулула. Возможно, это связывание приводит к активации рибосомального синтеза. Так, например, показано, что стероидные гормоны стимулируют синтез глутаматдегидрогеназы в матке, действуя на трансляцию, а не на транскрипцию этого белка.

При высоких концентрациях (в 100—1000 раз больших, чем физиологические) стероидные гормоны могут влиять на вязкость мембран и их проницаемость для ионов и неэлектролитов. Этот эффект связан, по-видимому, со встраиванием стероидных молекул в липидный бислой и может играть определенную роль при терапевтическом применении глюкокортикоидов. Как уже отмечалось (см. раздел 4.1), стероиды могут влиять на проницаемость мембран путем индукции синтеза мембранных белков, участвующих в транспорте ионов. Наряду с альдостероном, подобные эффекты могут вызывать, вероятно, и андрогены. Существуют данные о том, что тестостерон может индуцировать синтез альдолазы, некоторых ферментов цикла Кребса, кислой фосфатазы, а также Na^+ , K^+ -АТФазы.

Стероидные гормоны могут влиять и на процессы

химической модификации белков. Так, например, предварительное действие глюкокортикоидов на сердце и жировые клетки значительно усиливает их чувствительность к катехоламинам. Предполагается, что это связано с индукцией синтеза каких-то компонентов циклазной системы. Матка остается нечувствительной к окситоцину до тех пор, пока на нее не воздействуют эстрогены.

В свою очередь, циклические нуклеотиды могут влиять на проявление эффектов стероидных гормонов. В клетках прокариотов цАМФ, видимо, не влияет на реакцию химической модификации белков, но контролирует процессы репрессии и индукции синтеза белков (например, активность лак-оперона *E. coli*). В этих клетках обнаружен цАМФ-связывающий белок, по ряду свойств похожий на регуляторную субъединицу протеинкиназы эукариотов. Этот белок может взаимодействовать с ДНК и тем самым ускорять транскрипцию. Циклическая АМФ облегчает, а цГМФ затрудняет связывание данного белка с ДНК. Возможно, эта более древняя функция цАМФ сохранилась и в тканях животных. Е. С. Северину и его сотрудникам удалось обнаружить, что регуляторная субъединица протеинкиназы в комплексе с цАМФ может проникать в ядро клеток млекопитающих, связываться с хромосомами и, по-видимому, индуцировать образование определенных белков. Ни цАМФ в отсутствие связывающего белка, ни регуляторная субъединица протеинкиназы в отсутствие цАМФ подобными свойствами не обладают.

В гипофизе глюкокортикоиды увеличивают количество участков связывания РНК-полимеразы на ДНК. Если в гипофизе повысить концентрацию цАМФ, то глюкокортикоиды вызывают противоположный эффект — уменьшают число мест инициации синтеза мРНК. Показано, что цАМФ в комплексе со связывающим белком взаимодействует с негистоновыми белками, отличными от тех, с которыми связываются рецепторы глюкокортикоидов. Вероятно, цАМФ влияет не на связывание гормональных рецепторов с хроматином, а на более поздние процессы, опосредующие действие глюкокортикоидов на транскрипцию.

Система рецепции, проведения и реализации эффектов стероидных гормонов — самонастраивающийся механизм. Эстрогены могут усиливать синтез собственных

рецепторов; повторные инъекции любого из стероидных гормонов вызывают, как правило, более быструю и выраженную индукцию синтеза белка, чем первые.

Наличие рецепторов стероидных гормонов в клетке — не достаточное условие для того, чтобы в этой клетке происходила гормонзависимая индукция или репрессия синтеза белка. Как правило, в онтогенезе рецепторы появляются раньше, чем начинается секреция стероидов и формируются механизмы гормонзависимой индукции или репрессии синтеза белка. Рецепторы стероидов могут быть даже в таких тканях, которые, по видимому, никогда не становятся мишенями для этих гормонов. Так, по данным В. Б. Розена, в печени содержатся в больших количествах эстроген- и андроген-связывающие белки, имеющие, правда, меньшее сродство к гормонам, чем рецепторы тканей-мишеней.

Стероидные гормоны уже давно получили широкое применение в медицинской практике. Синтезировано и испытано более 20 000 аналогов этих гормонов. Созданы теоретические предпосылки для направленного синтеза новых аналогов. Для того чтобы предсказать сродство гормона к рецептору, а также его возможный биологический эффект, нужно ввести в компьютер сведения о стероиде по четырем пунктам: 1) гидрофобность молекулы; 2) угол наклона между кольцами А и В; 3) природа участков 11, 17 и 21; 4) природа заместителей в положении 9.

Несмотря на столь большой прогресс в химии стероидов, представления о молекулярных механизмах их действия, как мы видели, еще далеко не удовлетворительны. Это связано главным образом с отсутствием сведений о молекулярном механизме экспрессии генов у эукариотов. В решении этой важнейшей задачи молекулярной биологии стероидные гормоны могут оказаться весьма удобным инструментом.

Принципиальными различиями в механизмах действия стероидных и тиреоидных гормонов является то, что тиреоидный рецептор — это типичный белок хроматина, который в нормальных условиях не может войти или выйти из ядра и всегда прочно связан с ДНК. Если хроматин обрабатывать ДНКазой II, происходит параллельное уменьшение количества ДНК и тиреоидных рецепторов в хроматине. После фиксации хроматина формальдегидом не удается разделить ДНК

и тиреоидные рецепторы даже путем центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия, следовательно, формальдегид сшивает нуклеиновую кислоту с этим белком.

Концентрация этих рецепторов в ядре практически постоянна, она не зависит от количества тиреоидных гормонов в крови, не изменяется при тиреоидэктомии. Вторым отличием механизмов действия стероидных и тиреоидных гормонов является то, что в клетке-мишени тиреоидов обязательно должно произойти превращение гормона — дейодирование тироксина (T_4) до трийодтиронина (T_3). Подвергаться метаболизму в клетке-мишени могут и стероидные гормоны, но для них это превращение не обязательно. Так, например, тестостерон может превращаться в 5α -дигидротестостерон (см. раздел 2.2.3), что усиливает андрогенную активность гормона. В то же время в скелетных мышцах тестостерон оказывается более активным, чем дигидротестостерон.

Превращение T_4 в T_3 происходит путем удаления йода из 5'-положения тиронина. При дейодировании 5-положения тиронина образуется антагонист тиреоидных гормонов — 3,3',5'-трийодтиронин. В обычных условиях это соединение синтезируется в очень малых количествах.

В плазме крови преимущественно присутствует тироксин T_4 . Отщепляясь от T_4 -связывающих белков плазмы (см. раздел 2.3), тироксин проникает внутрь клеток-мишеней (рис. 82). По-видимому, как и в случае стероидных гормонов, проникновение внутрь клетки происходит за счет простой диффузии благодаря липофильности молекулы T_4 . Существует, однако, предположение, что в плазматической мембране печени этот транспорт осуществляют специальные белковые переносчики, имеющие достаточно высокое сродство к T_4 ($K_d = 10^{-9}$ М). Проникнув в клетку, T_4 дейодируется до 3,5,3'-трийодтиронина (T_3). Эта реакция происходит, вероятно, на мембранах эндоплазматического ретикулула. Рецептор тиреоидных гормонов, локализованный в ядре, имеет высокое сродство к T_3 ($K_d = 10^{-11} - 10^{-10}$ М) и в 100—1000 раз меньшее сродство к T_4 . Столь разное сродство рецептора к двум тиреоидным гормонам объясняется, видимо, эффектом ядерных белков, с которыми рецептор связан. Если его очистить от посторонних бел-

ков или же ослабить взаимодействие с ними путем применения растворов высокой ионной силы или прогревания, сродство рецептора к T_3 резко уменьшается. Гормонсвязывающие свойства рецептора, освобожденного от белков хроматина, приближаются к свойствам T_4 -связывающего преальбумина плазмы (см. раздел 2.3), участвующего в «транспорте» тиреоидных гормонов в

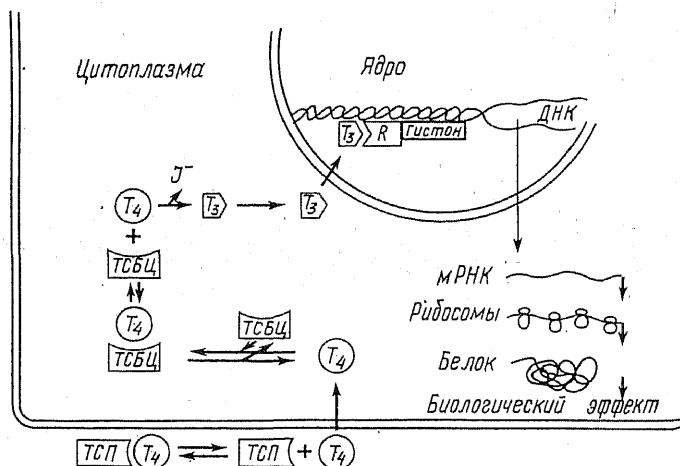


Рис. 82. Влияние тиреоидных гормонов на синтез белка: ТСП — тироксинсвязывающий преальбумин, ТСБЦ — тироксинсвязывающий белок цитоплазмы

крови. Интересно, что T_4 -связывающий белок плазмы в модельных опытах может связываться с ДНК подобно тиреоидному рецептору.

Рецептору, выделенному из хроматина, можно вновь вернуть высокое сродство к T_3 , добавив гистоны или экстракт хроматина. Этот эффект, вероятно, весьма специфичен — он не воспроизводится при замене гистонов на кислые или щелочные неядерные белки, АТФ, НАД⁺, ионы. Из белков хроматина наиболее выраженное влияние на тиреоидный рецептор оказывают гистоны H_3 и H_4 , а гистон H_1 и полный гистоновый комплекс имеют крайне слабый эффект. По-видимому, в ядре гистоны H_3 или H_4 связаны с тиреоидным рецептором и поддерживают ту конформацию рецептора, в которой он имеет большое сродство к T_3 .

В отличие от рецепторов стероидных гормонов, рецептор тиреоидов связан с хроматином и в отсутствие гормона. Гормон необходим рецептору T_3 только для запуска регуляторного процесса. При связывании T_3 с этим рецептором происходит перераспределение кислых белков на хроматине, повышается активность РНК-полимеразы II, образуются мРНК.

Обычно тиреоидные гормоны индуцируют в клетках-мишенях большее число белков (до 10—12), чем стероидные гормоны (до 5—7). Тиреоидным гормонам почти не свойственно репрессирующее влияние на синтез белков. Известно более 100 ферментов, которые активируются под действием T_3 и T_4 . Эти гормоны индуцируют образование глюкокиназы, глюкозо-6-фосфатазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, глицеринкиназы, α -глицерофосфатдегидрогеназы, малик-фермента, Na^+ , K^+ -АТФазы, гиалуронидазы и др. Для T_3 и T_4 весьма характерна индукция синтеза регуляторных белков, а также гормональных рецепторов, например для тиреолиберина в гипофизе. Действуя на сердце, тиреоидные гормоны индуцируют образование β -адренергических и снижают количество α -адренергических рецепторов, в результате чего усиливается стимулирующее влияние катехоламинов на процессы цАМФ-зависимого фосфорилирования.

Индукция образования ферментов метаболизма, тиреоидные гормоны стимулируют теплообразование. Возможно, эти гормоны могут также снижать КПД энергетических процессов, что также будет усиливать теплопродукцию. Так, например, активация липолиза, происходящая под действием T_3 и T_4 , может приводить к образованию жирных кислот, которые разобщают окисление с фосфорилированием. При высоких (на несколько порядков больших, чем физиологические) концентрациях T_3 и T_4 могут непосредственно связываться с митохондриями, вызывая их набухание и разобщение.

T_3 и T_4 могут связывать все субклеточные фракции, однако это связывание характеризуется низким сродством ($K_d = 10^{-7} - 10^{-6}$ М). Есть, однако, сведения о том, что в митохондриях печени и почек существуют рецепторы тиреоидных гормонов с константой сродства $2,5 \cdot 10^{11}$ М $^{-1}$. По данным Я. Х. Туракулова и Т. С. Саатова, рецепторы тиреоидных гормонов функционируют также в плазматических мембранах, причем через эти

рецепторы T_3 и T_4 могут активировать аденилатциклазу. Возможно, через эти рецепторы осуществляется также влияние тиреоидных гормонов на проницаемость мембран. В ряде случаев под действием T_3 и T_4 повышается транспорт в клетку ионов, аминокислот и нуклеозидов, причем эти эффекты не блокируются ингибиторами синтеза белка.

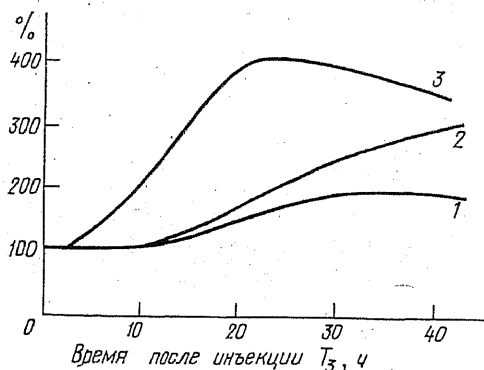


Рис. 83. Изменение содержания рибосом (1), мРНК (3) и скорости синтеза белка (2) под действием тиреоидных гормонов

Рецепторы T_4 есть также в цитоплазме (см. рис. 82), однако в отличие от рецепторов стероидов они не участвуют в транспорте гормона в ядро.

Наряду с метаболическими эффектами (активация транспорта и усиление обмена сахаров, аминокислот, фосфолипидов, жирных кислот, холестерина и креатина) тиреоидные гормоны оказывают выраженное влияние на рост и развитие организма, на дифференцировку тканей. Это влияние гормонов опосредуется главным образом так называемыми поздними эффектами тиреоидной стимуляции клеток. Через несколько часов после связывания T_3 с рецептором стимулируется РНК-полимераза I и II, усиливается синтез всех типов РНК, вследствие чего через 20—30 ч в клетке увеличивается число рибосом, растет сеть мембран эндоплазматического ретикулума, с которыми связаны рибосомы (рис. 83). Благодаря активации трансляции возрастает общий белковый синтез в клетках-мишенях. Следует отметить,

что такие эффекты наблюдаются только при низких концентрациях тиреоидных гормонов. Гиперфункция щитовидной железы или инъекция высоких доз T_3 и T_4 подавляют рост и развитие тканей. В этом отношении тиреоидные гормоны не отличаются от стероидных: так, например, эстрогены при низких концентрациях стимулируют секрецию либеринов и тропинов, а при высоких — тормозят.

В том случае, когда в одной и той же клетке есть рецепторы как стероидных, так и тиреоидных гормонов, их эффекты оказываются взаимозависимыми. Так, синтез гормона роста в гипофизе индуцируется как глюкокортикоидами, так и T_4 . Каждый из этих гормонов увеличивает матричную активность РНК-полимеразы и стимулирует синтез мРНК для гормона роста. При совместном действии двух гормонов наблюдается синергизм — резкое усиление синтеза гормона роста. Если один из гормонов (например, тиреоидный) индуцирует, а другой (например, стероидный) — репрессирует синтез одного и того же белка, то при совместном действии двух этих гормонов наблюдается либо ослабленная индукция, либо ослабленная репрессия синтеза данного белка.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

Мейнуоринг У. Механизмы действия андрогенов. М., Мир, 1979.

Механизм действия гормонов / Под ред. Я. Х. Туракулова. Ташкент, 1976.

Протасова Т. Н. Гормональная регуляция активности ферментов. М., Медицина, 1975.

Розен В. Б., Смирнов А. Н. Рецепторы и стероидные гормоны. М., Изд-во Моск. ун-та, 1981.

Циклические нуклеотиды / Под ред. С. Е. Северина. М., Наука, 1979.

Юдаева Н. А., Покровский Б. В., Протасова Т. Н. Механизмы действия гормонов. — В кн.: Биохимия гормонов и гормональной регуляции / Под ред. Н. А. Юдаева. М., Наука, 1976.

Blake C. C., Oatley S. J. Protein-DNA and protein-hormone interactions in prealbumin: a model of the thyroid hormone nuclear receptor? — *Nature*, 1977, vol. 268, p. 115—120.

Боеунаемс J. M., Dumont J. E. Models of dissociable receptors applicable to cyclic AMP-dependent protein kinases and membrane receptors. — *Mol. and Cell. Endocrinol.*, 1977, N 7, p. 275—295.

Dumont J. E. Action of hormones and neurotransmitters with

known receptors but unknown coupled effector systems. — Trends in Pharmacol. Sci., 1980, vol. 1, N 9, p. 219—222.

Earp H. S., Steiner A. L. Compartmentalization of cyclic nucleotide-mediated hormone action. — Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 1978, N 18, p. 431—459.

Gill G. N. A hypothesis concerning the structure of cAMP- and cGMP-dependent protein kinases. — J. of Cyclic Nucl. Res., 1977, N 3, p. 153—162.

Mukherjee C., Caron M. G., Mullikin D., Lefkowitz R. J. Structure-activity relationships of adenylyl cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: Determination by direct binding studies. — Molec. Pharmacol., 1976, N 12, p. 16—31.

Palfrey H. C., Alper S. L., Greengard P. Protein phosphorylation and the regulation of cation cotransport. — J. exp. Biol., 1980, N 89, p. 103—115.

Pharmacology of steroid contraceptive drugs/Eds. S. Garattini, H. W. Berendes. New York, 1977.

Pfeuffer T. Guanine nucleotide-controlled interactions between components of adenylyl cyclase. — FEBS Lett, 1979, vol. 101, N 1, p. 85—89.

Receptors and hormone action/Eds. B. O'Malley, L. Birnbaumer. New York—London, 1978.

Severin E. S., Nesterova M. V., Gulyaev N. N., Shlyapnikov S. V. Brain histone kinase: the structure, the substrate specificity and the mechanism of action, Edv. in enzyme regulation/Ed. D. Weber. New York, 1979, vol. 14, p. 407—444.

Thompson E., Lippman M. Mechanism of action of glucocorticoids. — Metabolism, 1974, N 23, p. 159—202.

ГЛАВА 5

РЕАЛИЗАЦИЯ ГОРМОНАЛЬНОГО СИГНАЛА В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ ОТВЕТ КЛЕТОК, ОРГАНОВ И ТКАНЕЙ

Биохимические и физиологические эффекты гормонов и нейромедиаторов рассмотрены во многих учебниках по биохимии, физиологии и эндокринологии, в многочисленных монографиях и сборниках, часть из которых указана в предисловии, а также в списке литературы, завершающем данную главу. Это освобождает нас от необходимости подробно останавливаться на этих вопросах, тем более, что только один перечень эффектов специфических регуляторов мог бы занять не один десяток страниц.

Как было показано в предыдущих разделах, основные эффекты гормонов и нейромедиаторов реализуются через изменение проницаемости мембран для ионов и метаболитов (см. разделы 1.2 и 4.1), химическую модификацию белков (см. разделы 1.3 и 4.2), а также индукцию — репрессию синтеза белка (см. разделы 1.4 и 4.3). Конечный физиологический или биохимический ответ зависит прежде всего от типа ткани, которая рецептировала данные регуляторы, и от функционального состояния этой ткани.

Реализация любого регуляторного сигнала в биологический эффект зависит также от того, какие регуляторные воздействия испытывала клетка до поступления этого сигнала, какие еще регуляторы действуют в момент развития сигнала, и даже от того, какие регуляторы будут действовать на клетку вслед за тем, когда рассматриваемый сигнал будет «погашен». Так, например, глюкокортикоиды стимулируют в печени синтез ферментов глюконеогенеза. Если вслед за глюкокортикоидами на печень будут действовать глюкагон или адреналин, стимулирующие реакции цАМФ-зависимого фосфорилирования, ускорится глюконеогенез — синтез сахаров из лактата и аминокислот, поступающих в печень. Инсулин оказывает на печень эффекты, противоположные глюкокортикоидам — препятствует синтезу

ферментов глюконеогенеза, поэтому после воздействия инсулина адреналин и глюкагон будут стимулировать главным образом реакцию распада гликогена. Глюкокортикоиды часто вызывают так называемое перmissive влияние на цАМФ-зависимый ферментный каскад (вероятно, индуцируя образование цАМФ-зависимых протеинкиназ или изменяя проницаемость мембран для Ca^{2+}). Инсулин, напротив, подавляет активацию аденилатциклазы глюкагоном и адреналином. Следовательно, глюкокортикоиды могут усиливать, а инсулин ослаблять регуляторный сигнал адреналина и глюкагона. В свою очередь, адреналин и глюкагон влияют на синтез белков, идущий под действием глюकोкортикоидов, и на транспорт веществ, идущий под действием инсулина.

Эти примеры показывают, что физиологический эффект определенного регулятора даже на одной и той же ткани не может быть всегда однозначным. В то же время, регуляторам свойственна высокая специализация: одни из них выступают в роли стимуляторов, а другие — ингибиторов определенных реакций и процессов. Лишь в редких случаях один и тот же регулятор (будь то гормон или нейромедиатор) в одних условиях может активировать, а в других — подавлять определенный процесс. Как правило, регуляторы работают в паре. Так, холинергические нервные волокна замедляют сердцебиение, а адренергические — ускоряют его, либерины стимулируют, а статины подавляют секрецию тропинов. Поэтому чаще всего для развития физиологического эффекта решающее значение может иметь не абсолютная концентрация гормона, а соотношение концентраций стимулирующего и ингибирующего гормонов.

Одной из наиболее важных и сложных проблем молекулярной эндокринологии является выяснение взаимосвязи, взаимоподчиненности и взаимодействия разных регуляторных сигналов и регуляторных механизмов при реализации биологического эффекта.

5.1.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЗНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ МЕХАНИЗМОВ НА УРОВНЕ КЛЕТКИ

Рассмотрим механизмы, через которые осуществляется связь между двумя важнейшими внутриклеточными регуляторами — ионами Ca^{2+} и циклическими

нуклеотидами. Поскольку многие нейромедиаторы и гормоны вызывают изменение концентрации этих регуляторов в клетке (см. разделы 4.1 и 4.2), на уровне взаимодействия Са-зависимых и цАМФ- или цГМФ-зависимых процессов осуществляется интегрирование эффектов многих внеклеточных регуляторов.

При первом знакомстве с ферментным каскадом усиления, в котором участвуют циклические нуклеотиды,

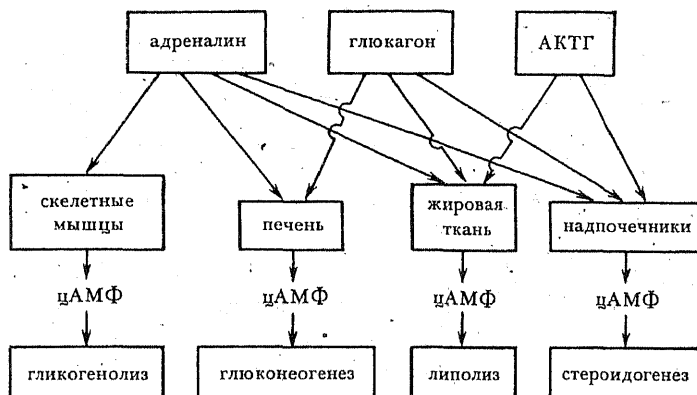


Рис. 84. Биологические эффекты адреналина, глюкагона и АКТГ на разных тканях

нередко вызывает недоумение тот факт, что десятки гормонов и гормоноподобных веществ действуют на клетку одним и тем же способом — путем повышения концентрации циклического нуклеотида, однако каждый из этих гормонов сохраняет свое «лицо», имеет свои, только ему присущие биологические эффекты. Это можно объяснить тем, что разные гормоны направляются по «разным адресам» — в те ткани, где есть соответствующие рецепторы. Часто гормон действует сразу на несколько тканей. Один и тот же регуляторный сигнал может вызывать на разных тканях совершенно различные эффекты. Так, например, катехоламины, повышая концентрацию цАМФ, стимулируют в скелетных мышцах гликогенолиз, в печени — глюконеогенез, а в жировых клетках — липолиз (рис. 84). Ответ ткани на регуляторный сигнал определяется набором генов и белков, функционирующих в данных клетках. Это по-

зволяет организму с помощью одного специфического регулятора контролировать самые разнообразные химические процессы. Эффекты, подобные катехоламинам, вызывает и глюкагон. Однако скелетные мышцы не содержат рецепторов глюкагона, поэтому данный регуляторный сигнал проявится лишь на печени (глюконеогенез) и на жировых клетках (липолиз). Секреция АКТГ приведет к активации липолиза в жировых клетках и стероидогенеза в надпочечниках, но не затронет скелетных мышц и печени, которые не имеют рецепторов АКТГ. Катехоламины, глюкагон и АКТГ действуют на ткани через один и тот же механизм — повышение внутриклеточной концентрации цАМФ. Однако несмотря на то, что они переводят свои сигналы на один и тот же язык — изменение концентрации цАМФ, биологические эффекты на уровне организма оказываются разными, так как сигналы этих гормонов «адресуются» разным тканям, а в разных тканях цАМФ-зависимому фосфорилированию подвергаются разные белки.

Избирательность действия специфических регуляторов на те или иные клетки полностью определяется наличием в клетках соответствующих рецепторов. Однако остается вопрос, одинаковые ли эффекты вызовут, например, на жировых клетках адреналин, глюкагон и АКТГ (все три гормона могут повышать концентрацию цАМФ в этих клетках). По-видимому, не всегда эффекты будут одинаковыми. Во-первых, каждый из этих гормонов может активировать аденилатциклазу только при определенных условиях. Так, например, сигнал от рецептора АКТГ на аденилатциклазу передается только в присутствии Ca^{2+} , а действие на фермент β -адренергических рецепторов и рецепторов глюкагона не требует присутствия Ca^{2+} . Активирующие эффекты АКТГ и глюкагона могут усиливаться под действием как ГТФ, так и ГДФ. Эффекты же β -адренергических рецепторов под действием ГТФ усиливаются, а под действием ГДФ блокируются. Во-вторых, кроме активации синтеза цАМФ эти гормоны могут иметь дополнительные пути влияния на клетку. Например, адреналин, связываясь с β -рецепторами, будет не только активировать аденилатциклазу, но и ингибировать транспорт Mg^{2+} (по механизму, независимому от цАМФ). Связываясь с α -адренергическими рецепторами, которые также есть в жировых клетках, адреналин может вызвать вход Ca^{2+} .

Глюкагон и АКТГ не имеют в жировых клетках рецепторов, через которые они могли бы влиять на проницаемость мембран для Ca^{2+} . В-третьих, степень активации аденилатциклазы каждым из этих гормонов разная. Различаются у них также скорости связывания и диссоциации от рецепторов, скорости инактивации. Следовательно, эти гормоны будут с разной скоростью и в разной степени изменять концентрацию цАМФ в клетке. Поскольку ферментный каскад, как мы видели (см. раздел 4.2), самонастраивающаяся система, разные по амплитуде и длительности изменения концентрации цАМФ в клетке могут приводить к разным биологическим эффектам.

Действие всех трех гормонов на аденилатциклазу жировых клеток неаддитивно, на основании чего предполагается, что одна и та же форма аденилатциклазы регулируется каждым из этих трех рецепторов. На мембранах сердца показано, что при таком способе регуляции совместное действие двух гормонов (например, адреналина и глюкагона) может привести к конкуренции соответствующих рецепторов за фермент и тогда произойдет «усреднение» активирующих эффектов двух гормонов — «менее активный» снизит эффект «более активного» (табл. 2). Следовательно, активирующее влияние определенного гормона может зависеть также от того, какие еще гормоны влияют в этот момент на данную клетку.

В ряде тканей показано, что расположение разных рецепторов на поверхности клетки может быть различ-

Таблица 2
Влияние гормонов на аденилатциклазу сердца кролика

Гормон	Активность аденилатциклазы, пмоль цАМФ/мг в 1 мин	Степень активации, отн. ед.
Без гормона	58,1	1,0
Глюкагон	88,8	1,4
Гистамин	109	1,9
Адреналин	167	2,9
Глюкагон + гистамин	95,2	1,6
Глюкагон + адреналин	122	2,1
Гистамин + адреналин	145	2,5

ным. Таким образом, два разных гормона могут стимулировать синтез цАМФ в двух разных участках клетки. Учитывая высокое сродство протеинкиназ к цАМФ, компартментализацию протеинкиназ, белковых модуляторов и белковых субстратов фосфорилирования, можно представить, что биологический эффект гормона зависит также от того, в каком месте клетки ускоряется синтез цАМФ. Определенную роль в этом может играть также компартментализация Ca^{2+} , поскольку, как мы видели (см. раздел 4.2), многие эффекты циклических нуклеотидов находятся под контролем этих ионов.

Процессы ассоциации — диссоциации олигомерного белкового комплекса, которым является аденилатциклаза (см. раздел 4.2.1), происходит в мембране. Скорость и прочность взаимодействия рецептора с *N*-белком, а *N*-белка — с каталитической субъединицей зависят от вязкости мембранных липидов. Существуют данные, что процессы передачи сигнала от мембранного рецептора на аденилатциклазу зависят от активности фосфолипазы A_2 и метилтрансферазы, превращающей фосфатидилэтаноламин в фосфатидилхолин. Эти ферменты, изменяя вязкость липидного бислоя, могут регулировать чувствительность клетки к гормонам. Оба фермента активируются при связывании катехоламинов с β -адренергическим рецептором или при повышении концентрации цАМФ в клетке, поэтому они могут участвовать в регуляции аденилатциклазы по механизму обратной связи.

Известно, что вязкость мембран зависит также от состояния мембранных белков. В мембране есть факторы (например, тубулиноподобные и актомиозиноподобные белки), способствующие агрегации — дезагрегации мембранных белков. Вязкость мембраны и подвижность мембранных рецепторов существенно зависят также от состояния микротрубочек и микрофиламентов, образующих так называемый цитоскелет. Как правило, факторы, вызывающие разрушение цитоскелета, влияют на синтез цАМФ. В свою очередь, цАМФ активирует реакции фосфорилирования тубулина и других белков. Это препятствует их деполимеризации и тем самым влияет на вязкость мембраны, в которой функционируют рецепторы и аденилатциклаза, синтезирующая цАМФ.

Активность и регуляторные свойства аденилатцикла-

зы зависят также от концентрации адениловых нуклеотидов и нуклеозидов — основных субстратов энергетического обмена клетки. Внеклеточный аденозин в концентрации 10^{-6} М может в несколько раз повысить скорость синтеза цАМФ. При накоплении аденозина внутри клетки до концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ М происходит ингибирование аденилатциклазы и значительное снижение активирующих эффектов гормонов и гуаниловых нуклеотидов. АТФ не только служит субстратом, но и усиливает влияние многих регуляторов на аденилатциклазу. Таким образом, скорость синтеза цАМФ контролируется не только внеклеточными (гормоны и нейромедиаторы), но и внутриклеточными факторами (гуаниловые и адениловые нуклеотиды и нуклеозиды, ферменты, сократительные элементы клетки и др.), что обеспечивает интеграцию разных регуляторных процессов.

Обмен липидов в мембране, процессы полимеризации — деполимеризации микротрубочек и микрофиламентов, синтез и гидролиз пуриновых нуклеотидов — все эти процессы находятся под контролем ионов Ca^{2+} . Следовательно, гормоны и нейромедиаторы, изменяющие концентрацию Ca^{2+} в клетке, могут влиять на развитие тех эффектов, которые реализуются путем синтеза цАМФ и последующего цАМФ-зависимого фосфорилирования.

Влияние Ca^{2+} на фосфодиэстеразу циклических нуклеотидов и ряд протеинкиназ было подробно рассмотрено в разделах 4.2.2 и 4.2.3. Известно также стимулирующее влияние Ca^{2+} на синтез цГМФ (см. раздел 4.2.1).

Следует отметить, что активирующее влияние Ca^{2+} на гуанилатциклазу так же, как и на фосфодиэстеразу (см. рис. 73), может опосредоваться кальмодулином. Во всяком случае, добавление к ферменту кальмодулина значительно усиливает активирующий эффект кальция на синтез цГМФ. В тканях мозга кальмодулин может активировать также аденилатциклазу. По мере изучения кальмодулина постоянно расширяется список ферментов и процессов, которые находятся под его контролем. Перечислим наиболее важные из них: аденилатциклаза, гуанилатциклаза, фосфодиэстераза, Са-зависимая протеинкиназа, киназа легких цепей миозина, киназа фосфолипазы, фосфолипаза A_2 , Ca^{2+} -АТФаза, НАД-киназа, фосфолирование мембран, высво-

бождение нейромедиаторов, деполимеризация микро-
трубочек, многие постсинаптические и ядерные процес-
сы. Во всех случаях эффекты кальмодулина выявляют-
ся только в присутствии Ca^{2+} , поэтому кальмодулин
можно рассматривать как полифункциональный белок,
сообщающий многим ферментам чувствительность к
ионам Ca^{2+} . Сродство кальмодулина к Ca^{2+} в 100 000 раз

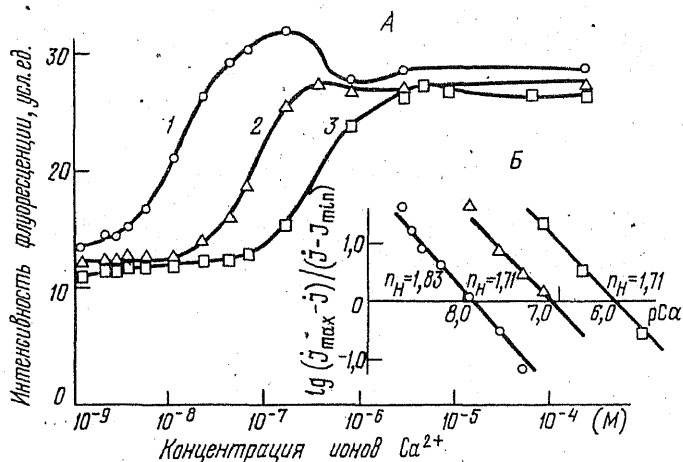


Рис. 85. Связывание Ca^{2+} с кальмодулином. По оси ординат показано изменение флуоресценции дансифированного кальмодулина — величина, пропорциональная связыванию Ca^{2+} с кальмодулином. А — прямые координаты, Б — те же данные, представленные на графике Хилла. 1 — в отсутствие ионов Mg^{2+} , 2 — в присутствии 10^{-3} М Mg^{2+} , 3 — в присутствии 10^{-2} М Mg^{2+} .

большее, чем к Mg^{2+} . Концентрация Mg^{2+} в клетке очень высока — около 10^{-2} М. Связываясь с камодулином, Mg^{2+} не в состоянии вызвать те же эффекты (присоединение белка к ферментам и их активация), которые вызывает Ca^{2+} . Ионы Mg^{2+} лишь уменьшают сродство кальмодулина к Ca^{2+} , при этом связывание Ca^{2+} протекает именно в области физиологических изменений концентраций этого иона (рис. 85).

Участие одного белка в регуляции ионами Ca^{2+} нескольких разных ферментов клетки обеспечивает согласованное изменение активности соответствующих процессов, так как эти ферменты приобретают одинаковое сродство к Ca^{2+} . Это играет важную роль в регуляции

концентрации цАМФ в клетке. Как видно из табл. 3, кальмодулин активирует Са-АТФазу, осуществляющую активный транспорт Ca^{2+} из клетки во внешнюю среду. Расмуссену удалось показать, что согласованная активация кальмодулином фосфодиэстеразы и Са-АТФазы обеспечивает циклическое повышение и снижение концентрации цАМФ в эритроцитах крысы при их длительной инкубации с катехоламинами (рис. 86).

Повышение концентрации цАМФ под действием катехоламинов приводит к фосфорилированию мембран, и Ca^{2+} входит внутрь эритроцита. Образуется комплекс Са-кальмодулин, который, присоединяясь к фосфодиэстеразе и Са-АТФазе, стимулирует как гидролиз цАМФ, так и выброс Ca^{2+} из эритроцита. В результате этого концентрация цАМФ снижается до исходного уровня, происходит дефосфорилирование мембран и замедляется вход Ca^{2+} в эритроцит. Параллельно этому осуществляется выброс ионов Ca^{2+} Са-АТФазой, стимулированной кальмодулином, поэтому снижается концентрация Ca^{2+} в цитоплазме. Ca^{2+} диссоциирует от кальмодулина, распадается комплекс кальмодулина с ферментом, и фосфодиэстераза возвращается в исходное, малоактивное состояние. Если в среде по-прежнему присутствуют катехоламины, то скорость синтеза начнет превышать скорость гидролиза цАМФ и концентрация циклического нуклеотида в эритроците снова начнет повышаться (см. рис. 86). Таким образом, кальмодулин обеспечивает преобразование длительного и постоянного регуляторного сигнала в циклические изменения внутриклеточной концентрации цАМФ. Этот процесс напоминает работу электрического преобразователя, который превращает постоянный ток в переменный. Подобно явлению десенсибилизации рецепторов (см. раздел 3.4), данный процесс может служить механизмом защиты клетки от «перевозбуждения» при длительном действии гормонов и нейромедиаторов. Не исключено также, что в некоторых случаях этот процесс обеспечивает ритмическую активность или автоматию клетки.

В состоянии покоя концентрация Ca^{2+} в цитоплазме составляет $5 \cdot 10^{-8}$ — 10^{-7} М. При активации клеток концентрация Ca^{2+} возрастает, например в нервных окончаниях и мышце до 10^{-6} — $5 \cdot 10^{-6}$ М (рис. 87). Столь незначительные изменения концентрации свободного ионизированного Ca^{2+} , приводящие к переходу клетки

из неактивного в активное состояние, происходят на фоне высоких концентраций кальция как внутри, так и вне клетки. Общая концентрация кальция в клетке равна 10^{-4} М. В межклеточном пространстве кальций содержится в концентрации $(2-3) \cdot 10^{-3}$ М. Большая часть кальция находится в связанном состоянии с мембранами

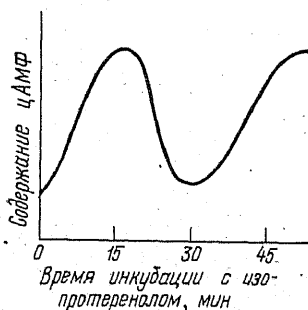


Рис. 86. Циклические изменения концентрации цАМФ в эритроцитах крысы при их инкубации с изопротеренолом. Объяснение см. в тексте

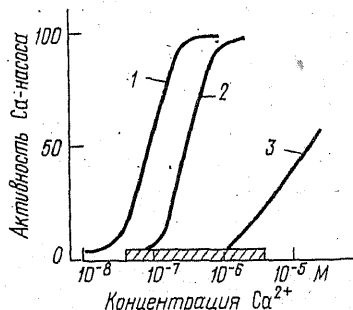


Рис. 87. Зависимость активности Ca^{2+} -насосов плазматических мембран (1), ретикулума (2) и митохондрий (3) от концентрации ионов Ca^{2+} . Максимальная активность каждого из насосов выражена в 100%. На оси абсцисс заштрихованный участок отражает пределы изменения концентрации ионов Ca^{2+} в клетке

митохондрий, эндоплазматического ретикулума и плазматической мембраной, внутри митохондрий и внутри цистерн эндоплазматического ретикулума. Часть Ca^{2+} связана с белками или другими макромолекулами межклеточной среды и цитоплазмы. Воздействие на Са-связывающие свойства любой из этих структур или на проницаемость мембраны может привести к изменению концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме и тем самым к активации клеток.

По мнению Карафоли, выход Ca^{2+} из некоторых структур (по крайней мере, из митохондрий) может вызываться изменением концентрации одновалентных катионов. Электрогенный протонный насос, функционирующий во внутренней мембране митохондрий, создает на этой мембране потенциал и градиент протонов. Этот

потенциал (отрицательный заряд на внутренней стороне мембраны) обеспечивает поступление Ca^{2+} в матрикс (возможно, за счет простого электрофореза), в результате чего подавляется фосфорилирование АДФ. Вход Na^+ в клетку при возникновении возбуждающего потенциала может приводить к выходу Ca^{2+} из митохондрий. Это наблюдается на возбудимых (мышцы) и не наблюдается на «невозбудимых» тканях (например, в печени). Предполагается, что выход Ca^{2+} из митохондрий происходит за счет $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмена.

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обмен обнаружен и на плазматических мембранах многих возбудимых тканей.

Радиусы ионов Na^+ и Ca^{2+} близки. Предполагается, что оба иона могут переноситься через один и тот же «канал». Действительно, на аксонах кальмара показано, что первая фаза входа Ca^{2+} при деполяризации может быть подавлена тетродотоксином — специфическим блокатором Na^+ -каналов. Однако вторая фаза входа Ca^{2+} нечувствительна к тетродотоксину, она подавляется ионами Mg^{2+} и Mn^{2+} , веществом Д-600 и верапамилем. « Ca^{2+} -каналы» могут быть как чувствительными, так и нечувствительными к изменению потенциала на мембране. Повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме приводит к усилению выхода K^+ из клетки, в результате чего мембрана гиперполяризуется. Таким образом, одновалентные катионы влияют на проницаемость мембран для Ca^{2+} , а ионы Ca^{2+} — на проницаемость для одновалентных катионов.

В возбудимых тканях концентрация Ca^{2+} повышается в основном за счет его входа через плазматическую мембрану (большая часть ионов — через потенциалзависимые каналы) или выхода из ретикулума. Эти два потока Ca^{2+} могут быть взаимосвязаны. Так, например, при возбуждении мышечной клетки через плазматическую мембрану в миоплазму поступают такие количества Ca^{2+} , которые в 15—20 раз меньше количества Ca^{2+} , обеспечивающего активацию сократительных белков. Тем не менее вошедший в клетку Ca^{2+} совершенно необходим для трансформации возбуждающего потенциала в механическую активность волокна, так как он облегчает выброс больших количеств Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. Некоторые авторы считают, что входящий в клетку Ca^{2+} — основной фактор электромеханического сопряжения.

Для перехода клетки из активного состояния в состояние «покоя» концентрация Ca^{2+} в цитоплазме должна понизиться. Определенную роль в этом могут играть Са-связывающие структуры клетки. Однако «полное» удаление Ca^{2+} из цитоплазмы достигается за счет функционирования специальных Ca^{2+} -насосов, переносящих Ca^{2+} через мембраны. Сродство Ca^{2+} -насоса митохондрий к Ca^{2+} очень низко — 10^{-4} — 10^{-5} М. Большая активность и высокое сродство Ca^{2+} -насоса ретикулума (10^{-7} М) позволяет ему перенести во внутриклеточные цистерны основные количества цитоплазматического Ca^{2+} , а «подчистку» завершает, по-видимому, Ca^{2+} -насос плазматической мембраны, активность которого меньше, но сродство к ионам несколько выше ($5 \cdot 10^{-8}$ М), чем у Ca^{2+} -насоса ретикулума (см. рис. 87). Обе Са-переносящие системы мембран функционируют против высоких градиентов Ca^{2+} (10 000-кратных), используя для активного транспорта энергию гидролиза АТФ.

Едва ли не бóльшая часть всех известных в настоящее время гормонов и нейромедиаторов может влиять на концентрацию ионов Ca^{2+} в цитоплазме (см. разделы 1.2 и 4.1). К числу таких регуляторов относятся и те агенты, которые повышают концентрацию цАМФ в клетке, поскольку путем цАМФ-зависимого фосфорилирования мембранных белков может изменяться как пассивная диффузия Ca^{2+} через наружные и внутренние мембраны, так и активный транспорт этих ионов (см. раздел 4.2). При цАМФ-зависимом фосфорилировании изменяются Са-связывающие свойства некоторых немембранных белков (например, киназы фосфоорилазы, см. рис. 77), что может приводить к изменению концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитоплазме.

Эффекты ионов Ca^{2+} и циклических нуклеотидов столь сложно переплетены, что в ряде случаев не удается выяснить, что было первичным — изменение концентрации Ca^{2+} , которое привело к изменению концентрации цАМФ и цГМФ, или же сначала изменилась концентрация циклического нуклеотида, а изменение концентрации Ca^{2+} было следствием прошедшего фосфорилирования белков. Так, например, до сих пор ведется дискуссия о том, какой эффектор — Ca^{2+} или цАМФ — ответствен за активацию фосфоорилазы при действии на печень катехоламинов. Существуют бес-

спорные доказательства того, что при действии на печень адреналина в клетках повышается концентрация цАМФ и Ca^{2+} . Показано, что в печени существуют как α -, так и β -адренергические рецепторы, поэтому неоднократно высказывалось предположение, что действуя на α -рецепторы адреналин стимулирует в гепатоцитах повышение концентрации Ca^{2+} (открытие «каналов»), а действуя на β -рецепторы — повышение концентрации цАМФ (активация аденилатциклазы). Однако после блокирования одного из этих рецепторов (α или β) адреналин по-прежнему вызывает оба эффекта: повышает концентрацию как цАМФ, так и Ca^{2+} , в результате чего активируется киназа фосфоорилазы и происходит фосфорилирование фосфоорилазы *В*. При одновременном блокировании двух типов рецепторов (α и β) полностью устраняется влияние адреналина на печень.

На уровне взаимодействия регуляторных механизмов, в которых участвуют Ca^{2+} и циклические нуклеотиды, может происходить интегрирование нервной и эндокринной систем (см. раздел 4.2.3, рис. 78), их объединение в единую нейроэндокринную систему регуляции.

Есть много общего, но существуют и принципиальные различия в механизмах проведения регуляторного сигнала нервной и эндокринной системами. Возбуждающий потенциал движется по нерву со скоростью от 1 до 100 м/с (скорость обратно пропорциональна толщине нервных волокон). Кровь переносит молекулы гормона в 100—1000 раз медленнее. Нервное окончание подходит к одной клетке и возбуждение передается только на эту клетку. Гормон активирует всю популяцию клеток, имеющих рецепторы этого гормона. Передача возбуждения с нерва на другую клетку осуществляется «химическим» путем: выделяется специальное химическое вещество (нейромедиатор), связывающееся с рецепторами иннервируемой клетки. Это самый медленный процесс в проведении нервного сигнала, однако и он происходит очень быстро по сравнению с типичной гормональной регуляцией. Прежде всего потому быстро, что расстояние от места секреции до места рецепции нейромедиатора (ширина синаптической щели) составляет всего 20—30 нм. Гормон проходит путь (от места секреции до места рецепции) в миллионы раз

больший (десятки сантиметров). При этом он разбавляется кровью, и поэтому его концентрация достигает всего 10^{-8} — 10^{-11} М. Кроме того, гормональные рецепторы чаще всего не сконцентрированы в определенном участке, а распределены в клетке диффузно. Концентрация их в ткани тоже очень мала (10^{-9} — 10^{-8} М). Гормону потребуется длительное время для того, чтобы «найти» свой рецептор и связаться с ним. В момент выброса концентрация нейромедиатора в синаптической щели составляет 10^{-4} — 10^{-3} М. Рецепторы в постсинаптической мембране сконцентрированы на очень малой площади, причем точно напротив тех мест пресинаптической мембраны, из которых выбрасывается нейромедиатор. Нейромедиатор сразу же связывается с рецептором. От момента секреции гормона до его связывания с рецептором проходят минуты или десятки минут, у нейромедиатора этот процесс занимает миллисекунды.

Биологические эффекты гормонов в подавляющем большинстве случаев опосредуются химическими процессами, например синтезом циклических нуклеотидов, а затем фосфорилированием белков (см. раздел 4.2) или же ускорением транскрипции и последующим синтезом белков (см. раздел 4.3). Эти процессы протекают медленно (минуты, часы) по сравнению с физическими процессами, вызываемыми нейромедиаторами (например, вход Na^+ и выход K^+ по градиенту их концентраций, что занимает 1—2 мс). Гашение гормонального сигнала также происходит медленно, так как гормоны инактивируются в основном в печени и почках, и для понижения концентрации гормона в крови ниже пороговой необходимо «прогнать» через эти ткани большое количество крови. Нейромедиаторы убираются из постсинаптической щели ферментами, сконцентрированными на постсинаптической мембране (например, ацетилхолин), или специальными механизмами «обратного захвата» нейромедиатора нервным окончанием (например, катехоламинами).

Для того чтобы гормон мог вызывать повторный эффект, необходимо вернуть биологическую систему в исходное состояние (разрушить цАМФ и дефосфорилировать белки или же инактивировать мРНК и индуцировавшиеся ферменты). Пассивные токи ионов, лежащие в основе нервного возбуждения, весьма кратковре-

менны, поэтому суммарные градиенты концентраций этих ионов изменяются незначительно. Даже при очень длительной и частой стимуляции Na^+ -насос справляется с поддержанием нужных градиентов, так как количество молекул Na^+ , K^+ -АТФазы в клетке в 5—10 раз больше, чем количество Na^+ -каналов. Нервные стимулы могут поступать на клетку с большой частотой. Наложение этих импульсов друг на друга происходит только за счет того, что нейромедиатор, выделившийся под действием одного импульса, не успел удалиться из синаптической щели к моменту выброса следующей порции нейромедиатора. Процесс инактивации нейромедиаторов происходит в синапсе за миллисекунды, поэтому в течение секунды на клетку может поступить до 500 нервных импульсов.

Известно, что нервный сигнал возникает по закону «все или ничего»: возбуждение, по силе много выше порогового, вызывает такое же изменение потенциала на мембране, как и пороговое возбуждение. На каждый возбуждающий сигнал, пришедший по нервному окончанию в синапс, выбрасывается одинаковая порция нейромедиатора. Естественно, что и ответ клетки, воспринимающей этот сигнал, также будет одинаков. Однако иннервируемая клетка умеет по-разному отвечать на сигналы, подающиеся с разной частотой.

Гормональной системе свойственна большая инерционность. Так, например, при употреблении большого количества углеводов в крови появляется глюкоза, которая стимулирует выброс инсулина поджелудочной железой. Инсулин стимулирует быстрый транспорт глюкозы в клетки, в результате чего содержание сахара в крови спустя несколько минут возвращается к норме. Однако инсулин продолжает действовать и после этого. В течение десятков минут, пока инсулин полностью не разрушится, может понижаться концентрация глюкозы в крови (теперь уже ниже нормы). Если при этом концентрация сахара в крови снизится ниже критической величины, стимулируется выброс глюкагона, который вызывает выход глюкозы из печени. Обладая такой же инерционностью действия, как и инсулин, глюкагон может повысить концентрацию глюкозы несколько выше нормы, и тогда вновь будет секретироваться инсулин (правда, в меньших количествах, чем сразу после приема сладкой пищи, так как второй сигнал

будет слабее первого). Так, постепенно затухая, гасится гормональная регуляция.

Особенности нервной регуляции определяются не свойствами нейромедиатора, а наличием синапса — специальной морфологической структуры, трансформирующей электрический сигнал нервной клетки в химический процесс, который, в свою очередь, приводит к «электрическому ответу» регулируемой клетки. Многие нейромедиаторы могут диффундировать из синаптической щели в кровь, и тогда они становятся типичными гормонами. Выделяясь в синапс, возбуждающие нейромедиаторы вызывают прежде всего появление возбуждающего потенциала на постсинаптической мембране. Но вместе с тем, они вызывают и гормональные эффекты на постсинаптической мембране. Так, например, норадреналин, выбрасываемый симпатическими нервными волокнами в синапс, не только вызывает возбуждающие потенциалы, но и активирует аденилатциклазу, локализованную в постсинаптической мембране. Ацетилхолин, секретируемый холинергическими волокнами, вызывает потенциалы действия в мышечном волокне, а также ингибирует аденилатциклазу и активирует гуанилатциклазу (по-видимому, за счет повышения концентрации Ca^{2+} в клетке), в результате чего в клетке резко снижается отношение концентраций цАМФ : цГМФ.

В свое время Грингард высказал предположение, что циклические нуклеотиды, вызывая фосфорилирование постсинаптической мембраны, могут открывать «каналы» пассивного транспорта ионов и тем самым быть посредниками в процессе возникновения возбуждающего потенциала в ответ на связывание нейромедиаторов с рецепторами. Это предположение не подтвердилось, и автор впоследствии отказался от него. Скорость химических процессов (в данном случае — синтез циклических нуклеотидов, фосфорилирование и дефосфорилирование белков) недостаточна для того, чтобы опосредовать такие быстрые физические процессы, как развитие потенциала действия. Гормональные механизмы могут играть лишь дополнительную, вспомогательную роль в процессах развития, проведения и реализации нервных сигналов. Так, через систему циклических нуклеотидов может проявляться «трофическое» влияние нервной системы на ткань, которое заключается в из-

менении метаболизма клетки при длительном возбуждении волокна, иннервирующего эту клетку. Эти эффекты нейромедиаторов опосредуются через типичные эндокринные механизмы регуляции. Кроме того, характер ответа клетки на нервный стимул может зависеть от того, в каком состоянии в данный момент в этой клетке находятся системы эндокринной регуляции. Нервный и гормональный стимулы, поступающие на одну и ту же клетку, могут усиливать, ослаблять или видоизменять эффекты один другого. Таким образом, эти два регуляторных механизма объединяются в единую нейроэндокринную систему регуляции не только на уровне организма, но и на уровне клетки. В некоторых случаях можно наблюдать одновременное и согласованное регуляторное влияние нервных и гормональных стимулов на уровне даже одного фермента. Например, киназа фосфорилазы может быть активирована как ионами Ca^{2+} , входящими в клетку под действием нервных стимулов, так и цАМФ, образующимися вследствие гормональной стимуляции клетки. При одновременном действии обоих регуляторных механизмов значительно усиливаются эффекты каждого из них. Нервные и эндокринные регуляторные процессы, активируя киназу фосфорилазы, стимулируют гликогенолиз. Согласованное действие обоих процессов позволяет осуществлять тонкую и высокоэффективную регуляцию гликогенолиза в определенных тканях в соответствии с определенными функциональными состояниями организма.

5.2.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАЗНЫХ РЕГУЛЯТОРНЫХ ПРОЦЕССОВ НА УРОВНЕ ОРГАНИЗМА

По выражению Клода Бернара, «неизменность внутренней среды организма есть основное условие полной независимости жизни». Неизменность внутренней среды, или гомеостаз, поддерживается за счет постоянного притока в клетку веществ и энергии. Редким исключением являются случаи, когда питательные вещества непосредственно служат строительным материалом клетки, не будучи разрушенными до более простых соединений. Для сохранения собственного «лица» организму нужны

полимеры «собственного изготовления», поэтому ткани животного идут на большие энергетические затраты, разрушая полимеры, поступившие извне, до более простых соединений (чаще всего до двух-, трехуглеродных), а затем строя из этих простых соединений собственные полимеры.

Потоки питательных веществ и энергии могут изменяться: в одних случаях резко превышать потребности клетки, а в других — не удовлетворять их. В соответствии с этим изменяется и соотношение скоростей катаболизма и анаболизма. В определенных случаях может происходить потребление собственных полимеров, менее важных для выживания (например, липидов и полисахаридов), для построения жизненно важных полимеров, таких, как белки и нуклеиновые кислоты.

В многоклеточном организме у группы клеток может возникнуть экстренная потребность в энергии. В этом случае осуществляется «перекачка» энергии и питательных веществ из других клеток. Подобный процесс наблюдается при выполнении тяжелой мышечной работы либо при подготовке организма к выполнению такой работы (например, при стрессе). При этом включаются нейрогуморальные механизмы, обеспечивающие снабжение мозга и мышц энергией главным образом за счет ресурсов печени и жировой ткани. Так осуществляется адаптация к изменившимся условиям существования, в данном случае к дополнительным потребностям в энергии, возникшим в нервных и мышечных клетках.

Когда организм животного находится в состоянии покоя, активность ферментов гликолиза и цикла Кребса определяется, по-видимому, только концентрациями внутриклеточных метаболитов и кофакторов. Если не происходит активного расходования энергии, то накапливаются АТФ и цитрат. Оба эти вещества оказывают ингибирующее влияние на фосфофруктокиназу — фермент, активность которого лимитирует скорость протекания гликолиза (см. раздел 1.1). Если в результате торможения гликолиза понижается концентрация АТФ, то при этом в клетке накапливается АДФ, который активирует фосфофруктокиназу и окисление изоцитрата (см. рис. 7), вследствие чего снижается концентрация цитрата и активность гликолиза вновь возрастает.

Голод или активная мышечная работа тоже приводят к накоплению АДФ и АМФ, активирующих многие

ферменты гликолиза и цикла Кребса (см. рис. 7). Кроме того, при этом снижается концентрация глюкозы в крови. Это состояние называют гипогликемией. При снижении концентрации глюкозы происходит активация нервных центров, под контролем которых находится метаболизм и секреция катехоламинов в мозговом веществе надпочечников (см. раздел 2.1), в результате в

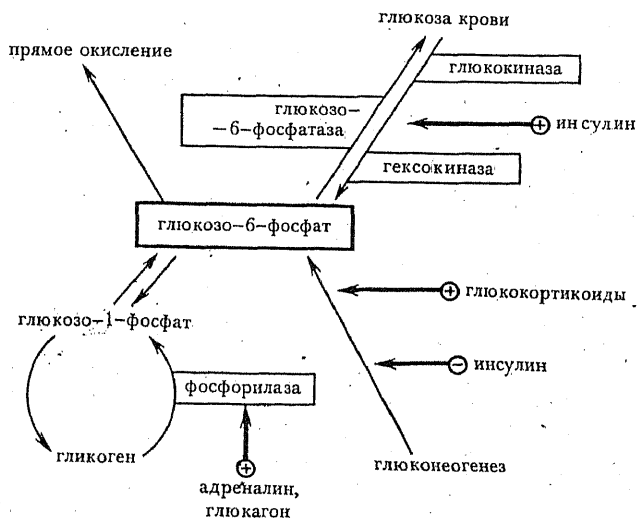


Рис. 88. Центральная роль глюкозо-6-фосфата в метаболизме сахаров в печени. Знаком плюс показано активирующее, а минус — ингибирующее влияние гормонов

кровь выбрасывается адреналин. Этот гормон стимулирует фосфорилазу (см. рис. 16), благодаря чему начинается гликогенолиз — расщепление гликогена. В мышечной ткани гликогенолиз завершается образованием пирувата и лактата, а в печени — глюкозо-6-фосфата, затем происходит дефосфорилирование сахара и глюкоза поступает в кровь (рис. 88).

Различия между метаболизмом фосфосахаров в мышечной ткани и печени объясняются тем, что в печени есть глюкозо-6-фосфатаза (фермент эндоплазматического ретикулула), а в мышцах этот фермент отсутствует. Кроме того, повышение концентрации цАМФ, происходящее под действием адреналина, не только активирует

фосфорилазу, но и ингибирует фосфофруктокиназу и пируваткиназу печени. Мышечная изоформа пируваткиназы не является субстратом цАМФ-зависимых протеинкиназ, а мышечная фосфофруктокиназа испытывает более слабое тормозящее влияние цАМФ, чем печеночный фермент.

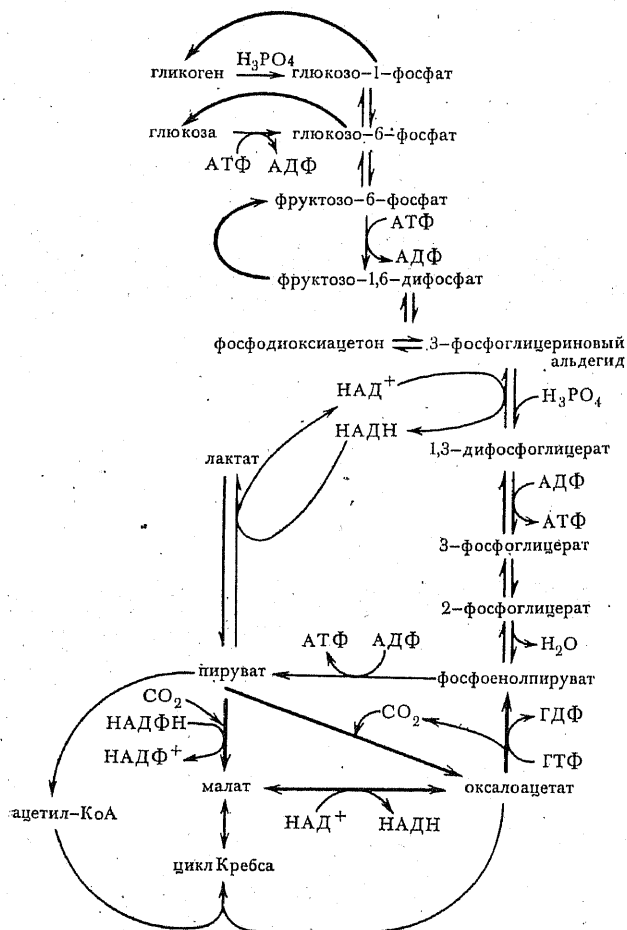


Рис. 89. Последовательность реакций при гликогенолизе и глюконеогенезе. Жирными стрелками выделены реакции, которые протекают при глюконеогенезе, но не участвуют в гликогенолизе

В жировой ткани адреналин через цАМФ-зависимые механизмы стимулирует липолиз (активация триглицеридлипазы и фосфолипазы A_2), а также высвобождение глицерина из клеток в кровь.

Адреналин стимулирует также секрецию АКТГ из передней доли гипофиза. Под действием АКТГ кора надпочечников начинает продуцировать глюкокортикоиды. Эти стероидные гормоны действуют как на мышечную ткань, так и на печень. В мышцах они вызывают высвобождение лактата, трикарбоновых кислот и аминокислот. В печени индуцируют образование глюкозо-6-фосфатазы и ферментов глюконеогенеза, т. е. активируют реакции синтеза глюкозы из лактата и пирувата (рис. 89). Кроме карбоновых кислот, образующихся в результате гликолиза и цикла Кребса, в глюконеогенез вступают также аминокислоты, глицерин и другие метаболиты. Превращение этих веществ в глюкозу также стимулируется глюкокортикоидами, так как эти гормоны индуцируют образование в печени целого ряда аминотрансфераз.

Адреналин также стимулирует глюконеогенез в печени, поскольку он вызывает торможение ферментов гликолиза (фосфофруктокиназы и пируваткиназы) и активирует фруктозо-1,6-дифосфатазу, которая катализирует одну из основных реакций глюконеогенеза — образование фруктозо-6-фосфата (рис. 90). Следует отметить, что противоположные эффекты адреналина на фосфофруктокиназу и фруктозо-1,6-дифосфатазу, а также на фосфорилазу и гликогенсинтазу предохраняют клетку от бесполезной траты энергии, поскольку при одновременной работе эти ферменты представляют собой АТФ-гидролизующие системы, превращающие энергию макроэргов в тепло (см. рис. 90). Если гормональное влияние отсутствует, в печени функционируют гликогенсинтаза и фосфофруктокиназа, в результате чего может протекать гликогенез и гликолиз. При действии адреналина или других гормонов, повышающих концентрацию цАМФ в клетке, активность гликогенсинтазы и фосфофруктокиназы снижается, а фосфорилаза и фруктозо-1,6-дифосфатаза переходят в активную форму, в результате чего начинают протекать гликогенолиз и глюконеогенез.

Помимо адреналина влияние на гликогенолиз и глюконеогенез оказывает глюкагон, который подобно

адреналину повышает концентрацию цАМФ в печени и который также секретируется в кровь при гипогликемии.

Благодаря действию адреналина на фосфорилазу в скелетных мышцах активируется гликогенолиз, который

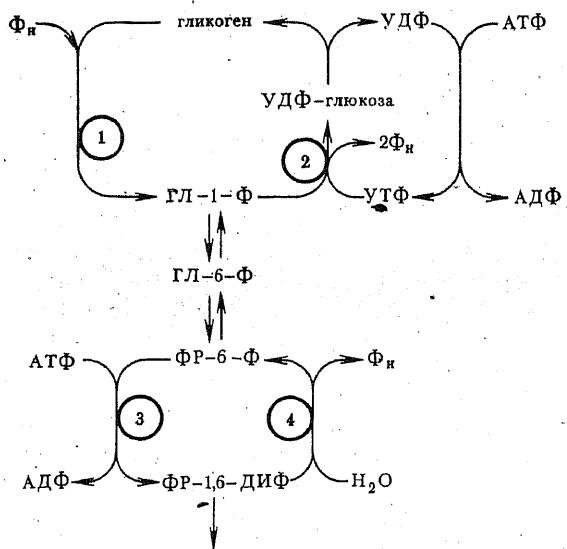


Рис. 90. Ключевые ферменты гликогенолиза и глюконеогенеза, катализирующие альтернативные реакции: 1 — фосфорилаза, 2 — гликогенсинтаза, 3 — фосфофруктокиназа, 4 — фруктозо-1,6-дифосфатаза

помимо продукции АТФ приводит к образованию в мышце лактата. Глюкокортикоиды стимулируют выброс лактата из мышц в кровь. Лактат поступает в печень и там быстро превращается в глюкозу, поскольку адреналин и глюкагон через процессы цАМФ-зависимого фосфорилирования, а глюкокортикоиды через индукцию — репрессию синтеза ферментов активировали в этой ткани глюконеогенез. Образующаяся в печени глюкоза выбрасывается в кровь и регуляторный сигнал гасится, так как в результате прошедших процессов концентрация глюкозы в крови постепенно начинает приближаться к норме.

Основным итогом этого сложного регуляторного механизма является то, что за счет распада гликогена печени и мышц в крови появляется глюкоза — важнейшее питательное вещество для мозга. В нервных клетках глюкоза — основной источник энергии. Она поступает в ткани мозга пассивно по градиенту концентраций без участия каких-либо переносчиков, поэтому данный процесс не регулируется инсулином и чрезвычайно чувствителен к снижению концентрации глюкозы в крови.

Концентрация глюкозы в крови обычно составляет 4—5 мМ. Если она повышается на 20—30% (вследствие приема пищи, богатой углеводами, или выброса в кровь больших количеств адреналина и глюкагона), происходит секреция инсулина (см. разделы 2.2.1 и 2.3). Интересно, что в отсутствие инсулина печень может выбрасывать глюкозу в кровь даже тогда, когда ее концентрация в крови составляет 10—20 мМ, а в присутствии инсулина печень начинает поглощать глюкозу из крови, и этот процесс может продолжаться даже тогда, когда концентрация глюкозы в крови снизится до 3 мМ.

Параллельно с активацией транспорта глюкозы инсулин подавляет синтез ключевых ферментов глюконеогенеза (фосфоенолпируваткарбоксикиназы и фруктозо-1,6-дифосфатазы), снижает концентрацию цАМФ в печени, тем самым инактивируя фосфорилазу и триглицеридлипазу, но стимулирует гликогенсинтазу и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, продуцирующую НАДФН — кофермент синтеза жирных кислот и глицерофосфата. В результате этого в печени начинается активный синтез гликогена и триглицеридов — создается запас высококалорийных и легко мобилизуемых питательных веществ.

Инсулин обеспечивает также поступление глюкозы, аминокислот и минеральных веществ в жировую ткань и тем самым активирует в ней липогенез, а действуя подобным образом на мышечную ткань, стимулирует в ней гликогенез.

Рассмотренные процессы включаются или выключаются путем изменения концентрации глюкозы в крови, они служат поддержанию этой концентрации на постоянном уровне. Однако метаболизм и перераспределение сахаров в организме может контролироваться

также высшими отделами ЦНС. Это осуществляется через те же эндокринные механизмы регуляции, но служит иной задаче — экстренной мобилизации всех энергетических ресурсов, что, по-видимому, имеет большое значение для животного, например при подготовке к нападению или бегству. Эту последовательность нейроэндокринных процессов обычно называют реакцией стресса.

Факторы стресса (страх, боль, повышенная или пониженная температура, изменение давления, яды, инфекция и т. д.) через нервные волокна активируют две ткани — мозговое вещество надпочечников, в результате чего секретируется адреналин (см. раздел 2.2.4), и гипоталамус, который через систему кортиколиберин — АКТГ (см. рис. 23) стимулирует синтез и секрецию из коры надпочечников глюкокортикоидов. Совместное влияние этих гормонов мы уже рассмотрели на примере регуляции уровня глюкозы в крови. Стоит отметить, что данные гормоны стимулируют также синтез и секрецию друг друга, как бы всегда стремясь работать в паре. Так, например, катехоламины усиливают секрецию кортиколиберина, а глюкокортикоиды не только перmissивно усиливают эффекты катехоламинов (см. раздел 2.2.2), но и индуцируют образование в мозговом веществе надпочечников метилазы, превращающей норадреналин в адреналин (см. раздел 2.2.4).

Эффекты этих гормонов не ограничиваются поддержанием концентрации сахара в крови на постоянном уровне. Адреналин, например, сужает кровеносные сосуды кожи и почек, но расширяет сосуды мозга и мышц, облегчая тем самым их снабжение кислородом и питательными веществами. Однако основная функция катехоламинов и глюкокортикоидов сводится к ускорению катаболических процессов (глюкокортикоиды вызывают анаболический эффект только в печени). Поэтому данные гормоны могут мобилизовать организм лишь на короткое время, а при длительном действии (или при высоких концентрациях) приводят к его ослаблению, что, в частности, может выражаться в появлении язв в желудке и кишечнике, ослаблении защиты от воспалительных процессов и т. п.

Стрессовые факторы стимулируют в гипоталамусе секрецию не только кортиколиберина, но и соматолиберина, в результате чего в крови появляется гормон

роста (см. раздел 2.1) — один из наиболее мощных стимуляторов анаболизма. Этот гормон является ростовым только на определенных стадиях онтогенеза. Во взрослом организме он не влияет на рост костной ткани, но стимулирует общий белковый обмен, активизирует иммунную систему, вызывает образование факторов роста нервов и эпидермиса. Действуя на печень, гормон роста стимулирует образование рРНК, белковых компонентов эндоплазматического ретикулума, увеличивает число рибосом, которые ускоряют общий белковый синтез. Отметим, что глюкокортикоиды оказывают на печень противоположное действие — индуцируют образование только ферментов глюконеогенеза, а общий белковый синтез подавляют.

Под действием гормона роста в печени образуются соматомедины — белковые гормоны, которые подобно инсулину стимулируют поступление глюкозы в мышечные и жировые клетки, однако в отличие от инсулина не подавляют, а активируют глюконеогенез в печени и повышают выход глюкозы в кровь.

При стрессе значительно ускоряются процессы переноса лактата и аминокислот в печень, синтез из этих субстратов глюкозы и последующая ее утилизация (данные взаимопревращения веществ, сопряженные с их переносом кровью от одних тканей к другим, называют циклом Кори). Участие в реакциях стресса помимо адреналина, глюкокортикоидов и инсулина еще двух гормонов — соматотропина и образующихся под его влиянием соматомединов — существенно усложняет регуляторные механизмы, обеспечивая одновременное протекание как катаболических, так и анаболических процессов. В этом заключаются основные отличия стрессовой реакции от реакций организма на гипо- или гипергликемию. Благодаря таким отличиям при стрессе не только повышается работоспособность животного, но мобилизуются едва ли не все защитные силы организма — повышается его устойчивость к холоду, инфекционным и воспалительным процессам, ядам и даже радиации.

Процессы катаболизма и анаболизма тесно связаны также с поддержанием постоянной температуры тела. Основным источником тепла в организме теплокровного животного являются метаболические процессы. Их КПД равен лишь 30—40%, из чего следует, что большая

часть энергии химических связей превращается в тепло. Едва ли можно регулировать КПД определенной химической реакции в клетке. Однако КПД определенных биохимических циклов, как мы видели на примере фосфофруктокиназы и фруктозо-1,6-дифосфатазы или фосфоорилазы и гликогенсинтазы (см. рис. 90), регулировать можно. Если в результате регуляторных воздействий активности, например, фосфофруктокиназы, и фруктозо-1,6-дифосфатазы окажутся равными, то КПД суммарной реакции снизится до нуля и вся энергия гидролизующегося АТФ будет превращаться в тепло. Подобное, по-видимому, происходит при некоторых патологических состояниях организма. При этом наблюдается выраженная гипертермия, которая может привести к смерти животного или человека. Нейроэндокринные факторы, регулирующие соотношение активностей подобных ферментов, играют важную роль в поддержании температуры организма.

По данным В. П. Скулачева, при охлаждении организма происходит разобщение окисления с фосфорилированием, и вся энергия окислительных реакций превращается в тепло. В этом разобщении участвуют, вероятно, свободные жирные кислоты, которые повышают протонную проводимость митохондриальной мембраны. Процессы образования свободных жирных кислот стимулируются под действием целого ряда гормонов (прежде всего тех, которые повышают концентрацию цАМФ в клетке), поэтому представляется вероятным, что КПД окислительного фосфорилирования (а следовательно, и количество тепла, выделяющегося при этом) находится под контролем нейроэндокринной системы.

Чрезвычайно важную роль в термогенезе играет щитовидная железа. В последнее время исследователи, изучающие эти процессы, приходят к выводу, что основной эффект тиреоидных гормонов на термогенез сводится к индукции ряда АТФ-расщепляющих ферментов, прежде всего Na^+ , K^+ -АТФазы, при работе которой расходуется до 20—50% энергии, потребляемой покоящейся клеткой.

Включение нейрогуморальных механизмов регуляции термогенеза происходит при изменении температуры внутри черепа всего на $0,01^\circ\text{C}$. Большое разнообразие способов регуляции температуры, возможно, связано с тем, что центр терморегуляции расположен в гипо-

таламусе — в ткани, которая стоит на перекрестке всех нейроэндокринных связей организма.

Важным фактором гомеостаза является также водно-солевой баланс организма. От концентрации солей зависит потенциал на мембране, активность многих ферментов, функциональное состояние хроматина и рибосом, компартментализация веществ в клетке и т. д. Вода, в свою очередь, не только служит растворителем, но и участвует в поддержании определенной структуры биополимеров, определяет давление крови и лимфы в сосудах, участвует во многих химических реакциях, протекающих в клетке.

Концентрация солей в клетках регулируется многими гормонами и нейромедиаторами, контролирующими проницаемость мембран как для катионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} и Mg^{2+}), так и анионов (Cl^- , HPO_4^{2-} , аминокислот, трикарбоновых кислот и др.) (см. разделы 1.2 и 4.1). Транспорт воды через мембраны большинства тканей — процесс, непосредственно нерегулируемый, он происходит пассивно в направлении высоких концентраций солей.

Решающее значение для всего водно-солевого баланса организма имеет содержание солей и воды в крови. В поддержании гомеостаза крови принимают участие многие нейроэндокринные механизмы регуляции. Мы остановимся лишь на регуляции содержания Na^+ и воды. Недостаток Na^+ и избыток K^+ в крови снижают потенциал покоя клеток коры надпочечников и тем самым стимулируют синтез и секрецию альдостерона — основного минералокортикоида, который усиливает активный транспорт Na^+ из клеток сердца, печени и скелетных мышц (при этом в обмен на 3 иона Na^+ внутрь клетки входит 2 иона K^+), а кроме того, способствует задержке ионов Na^+ в крови и во всех других жидкостях организма.

Существуют и рефлекторные механизмы регуляции транспорта Na^+ через мембраны: при снижении давления крови включается ренин-ангиотензиновая система (см. раздел 2.2.1), в результате чего также стимулируется синтез и секреция альдостерона. Задержка Na^+ в крови, которую осуществляет альдостерон, приводит к повышению ее осмотического давления, вследствие чего вода начинает переноситься из клеток в кровь и поэтому кровяное давление повышается.

Помимо альдостерона давление крови регулирует также антидиуретический гормон (АДГ) — пептид, образующийся в нейронах гипоталамуса и секретируемый нейрогипофизом. Если альдостерон стимулирует только перенос Na^+ в кровь, а вода при этом движется в сторону выравнивания осмотического давления, то АДГ непосредственно влияет на переход воды через клеточную стенку. Предполагается, что АДГ, связываясь с мембранными рецепторами дистальных канальцев нефрона, вызывает активацию аденилатциклазы, в результате чего растет концентрация цАМФ и поэтому происходит фосфорилирование апикальной мембраны канальца. Обычно эта мембрана труднопроницаема для воды. После фосфорилирования мембраны пассивный транспорт воды из просвета канальца в кровь возрастает. Кроме того, АДГ вызывает сужение капилляров, периферических артериол, легочных и коронарных сосудов. Все эти процессы приводят как к снижению осмотического давления крови, так и к повышению кровяного давления.

Секреция АДГ регулируется анализаторами осмотического давления, расположенными в кровеносных сосудах. При повышении концентрации солей в крови более чем на 2% сигнал от этих анализаторов по первым волокнам передается на гипоталамус, в аксонах которого содержится АДГ, и вызывает секрецию этого гормона.

В отличие от АДГ, минералокортикоиды не реагируют на концентрацию солей в крови. Синтез и секреция альдостерона находится под контролем анализаторов давления или, как их еще называют, барорецепторов сосудов почки. При снижении кровяного давления барорецепторы вызывают секрецию почкой ренина. Как мы уже видели (см. раздел 2.2.1), под действием ренина образуется ангиотензин-II, который стимулирует в надпочечниках синтез альдостерона. Однако ангиотензин-II действует не только на надпочечники, но и на гипоталамус. Связываясь с рецепторами гипоталамуса, он стимулирует секрецию АДГ. Таким образом, барорецепторы через ангиотензин-II вызывают появление в крови двух гормонов, один из которых стимулирует поступление в кровь ионов Na^+ (альдостерон), а другой — воды (АДГ). Это приводит к быстрому увеличению обмена циркулирующей крови, в результате чего повышается артериальное давление. Анализаторы рас-

положенные в артериолах, перестают посылать сигналы в почки, секреция ренина прекращается. Спустя 10—30 мин ренин крови инактивируется. Ангиотензин-II распадается до неактивного гексапептида и прекращает свое влияние как на секрецию АДГ, так и на синтез альдостерона и других минералокортикоидов.

Следует обратить внимание на то, что по характеру вызываемых эффектов АДГ и альдостерон различны: первый снижает, а второй повышает осмотическое давление крови. Поэтому рефлексорные механизмы регуляции устроены так, что снижение осмотического давления крови приводит к секреции альдостерона, а повышение осмотического давления стимулирует секрецию АДГ. Когда же снижается общее кровяное давление (например, вследствие тяжелых кровопотерь), тогда мобилизуются оба гормона, совместное действие которых вызывает эффект, подобный внутривенной инъекции физиологического раствора.

В рассмотренных нами примерах гуморальные факторы (глюкоза, Na^+ и K^+) подключали эндокринные системы регуляции к поддержанию гомеостаза (концентрация глюкозы или Na^+ в крови). Рефлексорные факторы (ЦНС — гипоталамус — гипофиз — кора надпочечников или же барорецепторы — ренин — ангиотензин — кора надпочечников) подключают эндокринную регуляцию главным образом тогда, когда возникает необходимость в адаптации организма к изменившимся условиям существования или при резком нарушении гомеостаза. Эту закономерность можно проследить на многих других примерах участия нейроэндокринной регуляции в поддержании гомеостаза и адаптации организма.

Различные анализаторы, сообщающие о состоянии тех или иных систем организма (осмо- и барорецепторы, центры жажды, терморегуляции, рецепторы обоняния и осязания, слух, зрение и др.), имеют связь с разными нейроэндокринными путями регуляции. У разных видов животных сила воздействия определенного анализатора на нейроэндокринную систему может быть различной. Так, например, обоняние у животных регулирует секрецию многих гормонов, однако у крыс определенные запахи столь существенно нарушают секрецию стероидных гормонов, что могут прерывать беременность, а у собак, также обладающих прекрасным

обонянием, эти анализаторы оказывают гораздо меньшее влияние на цикличность образования половых гормонов.

Относительная сила воздействия того или иного анализатора может зависеть и от пола животного или человека. Так, например, обоняние оказывает значительно большее влияние на образование стероидных гормонов у женщин, чем у мужчин. По-видимому, существует и обратная связь — влияние нейроэндокринной системы на развитие тех или иных анализаторов. Продолжая в качестве примера рассматривать обоняние, можно отметить, что существуют запахи, к которым не чувствительны мужчины, но весьма восприимчивы женщины. После инъекции эстрогенов — женских половых гормонов — мужчина на определенное время приобретает способность чувствовать эти запахи.

Подключение тех, а не иных нейроэндокринных механизмов регуляции может зависеть также от силы воздействия на соответствующий анализатор. Так, например, барорецепторы вен стимулируют преимущественно секрецию АДГ, а барорецепторы артерий — секрецию как АДГ, так и альдостерона. При снижении давления крови барорецепторы вен оказываются в выигрышном положении — относительное изменение давления в венах большее, чем в артериях, поэтому при малом снижении давления произойдет активация барорецепторов вен и в кровь выделится АДГ. При большем снижении давления сигнал будет воспринят и барорецепторами артерий, в результате чего будет активирован синтез и секреция минералокортикоидов.

Эффекты АДГ реализуются через реакции цАМФ-зависимого фосфорилирования, поэтому они быстро развиваются и исчезают почти сразу же после устранения гормона (см. раздел 4.2). Эффекты стероидных гормонов (альдостерона и других минералокортикоидов) развиваются в течение десятков минут или часов и могут сохраняться продолжительное время (часы, дни) после удаления этих гормонов (см. разделы 1.4 и 4.3). Очевидно, что «оперативные» гормоны имеют преимущества в коррекции слабого или кратковременного отклонения системы от нормы. Стероидные и тиреоидные гормоны подключаются главным образом тогда, когда происходит резкое нарушение гомеостаза или возникает необходимость адаптироваться к новым

условиям существования. Подобная закономерность наблюдается не только при регуляции давления крови, но и при регуляции метаболизма сахаров, поддержании постоянной температуры тела, а также при регуляции многих других процессов, протекающих в организме животного или человека.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ЛИТЕРАТУРА

- Вилли К., Детье В. Биология. М., Мир, 1974.
- Джекобсон М. Половые феромоны насекомых. М., Мир, 1976.
- Доман Н. Г., Феденко Е. П. Биологическая роль циклического АМФ. — Успехи биол. химии, 1976, № 17.
- Клегг П., Клегг А. Гормоны, клетки, организм. М., Мир, 1971.
- Мак-Мюррей У. Обмен веществ у человека. М., Мир, 1980.
- Молекулярные основы патологии / Под ред. В. Н. Ореховича. М., Медицина, 1966.
- Нормальная физиология / Под. ред. А. В. Коробкова. М., Высшая школа, 1980.
- Ньюсхолм Э., Старт К. Регуляция метаболизма. М., Мир, 1977.
- Селье Г. Очерки об адаптационном синдроме. М., Мир, 1960.
- Трумэн Д. Биохимия клеточной дифференцировки. М., Мир, 1976.
- Хочачка П., Сомеро Дж. Стратегия биохимической адаптации. М., Мир, 1977.
- Burkard W. P. Adenylate cyclase in the central nervous system. — Progress Neurobiology, 1976, vol. 4, p. 241—267.
- Cheung W. Y. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. — Science, 1980, vol. 207, N 4426, p. 19—27.
- Eigenbrodt E., Glossmann H. Glycolysis — one of the keys to cancer? — Trends in Pharmacol. Sci., 1980, vol. 1, N 9, p. 240—245.
- Exton J. H. Mechanisms involved in alpha-adrenergic effects of catecholamines in liver metabolism. — J. of Cyclic Nucl. Res., 1979, vol. 5, N 4, p. 277—287.
- Kretsinger R. H. Evolution and function of calcium binding proteins. — Int. Rev. Cytol., 1976, vol. 46, p. 323—393.
- Puck T. T. Cyclic AMP, the microtubule-microfilament system, and cancer. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, vol. 74, N 10, p. 4491—4495.
- Roach P. J., Lerner J. Covalent Phosphorylation in the regulation of glucogen synthase activity. — Mol. and Cell. Biochemistry, 1977, vol. 15, N 3, p. 179—200.
- Szabadi E. A model of two functionally antagonistic receptor populations activated by the same agonist. — J. theor. Biol., 1977, vol. 69, p. 101—112.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы ознакомились с рядом механизмов, через которые осуществляется действие внеклеточных регуляторов — гормонов и нейромедиаторов. С помощью этих же механизмов на клетку могут влиять некоторые яды, токсины и лекарственные вещества. Вероятно, существуют еще какие-то, пока неоткрытые молекулярные механизмы действия специфических регуляторов — многие эффекты гормонов и нейромедиаторов не удается объяснить с помощью тех механизмов регуляции, которые известны в настоящее время.

Мы рассмотрели также роль нейроэндокринной регуляции в создании упорядоченности, свойственной биологическим системам, в согласовании скорости, направления и пути протекания биохимических и физиологических процессов. При этом мы знакомимся преимущественно с теми процессами, которые происходят в организме человека и высших животных. Однако многие положения молекулярной эндокринологии, рассмотренные нами, вполне применимы и для низших животных, растений и даже микроорганизмов. Хорошо известно, например, что тироксин (T_4) и трийодтиропин (T_3) вызывают метаморфоз у земноводных, стимулируя у них реакции образования энергии, увеличивая сеть мембран эндоплазматического ретикулума и количество рибосом, т. е. на молекулярном уровне действуя точно так же, как и в организме млекопитающих (см. раздел 4.3).

У некоторых насекомых метаморфоз и линьку вызывает экдизон — стероидный гормон, который встречается также во многих растениях. Эффекты экдизона удобно изучать благодаря тому, что в слюнных железах личинок этих насекомых есть политенные хромосомы. Под микроскопом на них видны диски, каждый из которых представляет собой определенный ген или группу генов. В процессе развития личинки в хромосомах появляются вздутия, представляющие собой участки ДНК, на которых происходит интенсивный синтез РНК. По-видимому, в каждом вздутии синтезируется определенная мРНК. Введение личинкам экдизона приводит точно к таким же изменениям: начинается образование вздутий на политенных хромосомах, причем в тех же местах и в той же временной последовательности, что и при нормальном развитии личинки. Все эти

эффекты блокируются актиномицином Д и нечувствительны к пурамицину.

У растений превращение вегетативной почки в цветущую вызывает гормон цветения. Это также стероид, по структуре близкий к эстрогенам. Этот гормон образуется под воздействием света (здесь есть аналогия со светочувствительным синтезом мелатонина в эпифизе человека и животных, см. раздел 2.1). Гормон цветения вызывает дерепрессию генома и активирует синтез мРНК.

Рост стеблей у растений стимулирует индолуксусная кислота, а гибберелловая кислота способствует развитию семян и почек, вызывая в них образование ферментов, таких, например, как α -амилаза.

Эффекты всех этих растительных гормонов, как и основные эффекты стероидных и тиреоидных гормонов в организме животного, блокируются актиномицином Д и пурамицином. Вероятно, основные принципы действия регуляторов на экспрессию генома у растений и животных сходны.

Существуют и специфические черты гормональной регуляции у растений. Так, например, ауксин ускоряет созревание плодов путем активации синтеза этилена.

О важности гормонов в эволюции живого можно судить по тому, что T_3 и T_4 есть в одних из самых древних организмов на Земле — в синезеленых водорослях, а катехоламины — у многих одноклеточных.

Даже у микроорганизмов мы можем наблюдать эффекты специальных веществ, которые не являются промежуточными продуктами метаболического цикла, а несут информацию об общем функциональном состоянии клетки. Так, например, при недостаточном энергообеспечении многие прокариоты выделяют в окружающую среду вещества, которые служат сигналом к прекращению деления и дальнейшего роста клеточной популяции. В роли такого вещества у *E. coli* выступает цАМФ, нуклеотид, который у животных, как мы видели (см. разделы 1.3 и 4.2), выполняет совершенно иную функцию — служит посредником в реализации регуляторного сигнала некоторых гормонов.

Миксомицеты (слизевики) начинают свою жизнь как одноклеточные. При истощении пищи они выделяют в среду цАМФ, который является аттрактантом для других клеток слизевика, и тем самым вызывает

их объединение в многоклеточный организм (гриб). После того, как в грибе вегетативным путем образуются споры, происходит их рассеивание и появление новых одноклеточных организмов.

У растений и микроорганизмов специфические регуляторы выполняют ту же функцию, что и у животных — участвуют в адаптации к изменяющимся условиям существования и в поддержании гомеостаза. Принципиальным отличием регуляторных механизмов животных от регуляции, свойственной низшим формам живого, является то, что у животного в этих процессах участвует еще и нервная система, мозг, который Дж. Экклз назвал «самой удивительной и организованной структурой во Вселенной».

Благодаря существованию нейроэндокринных связей, у животного методом «проб и ошибок» могут вырабатываться и закрепляться определенные, наиболее полезные для него реакции на изменения, которые происходят в окружающей среде. Благодаря врожденным и выработанным рефлексам, животное может «предугадывать» наступление тех или иных событий и заранее подготавливаться к ним путем активации определенных нейроэндокринных систем (например, эмоциональный стресс, часто предшествующий психическим или мышечным нагрузкам). Благодаря мозгу животное может не только приспосабливаться к окружающей среде, но и «сознательно» в ней перемещаться, выбирая наиболее подходящую для него среду обитания. Наконец, благодаря мозгу появилась возможность изменять среду, приспосабливать ее к нуждам организма (сознательная деятельность человека).

Гормоны влияют на процессы, протекающие в мозге (обучение, память, поведение, см. раздел 2.1). Мозг, в свою очередь, контролирует активность эндокринных желез. Вряд ли имеют смысл рассуждения о том, какая — нервная или эндокринная — система регуляции более важна. В организме животного эти регуляторные процессы не работают обособленно. Они дополняют друг друга, образуют функционально единый механизм. Это единство придает нейрогуморальной регуляции высокую эффективность, ставит ее во главе всех регуляторных процессов, обеспечивающих согласованность процессов жизнедеятельности в многоклеточном организме.