

УДК 612.12.018:577.175.62:].08
©Попов, Капич

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ТЕСТОСТЕРОН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛОБУЛИНА КРОВИ И ВОЗМОЖНОСТИ ИХ РЕГУЛЯЦИИ

Е.Г. Попов^{1}, А.Н. Капич²*

¹Институт радиобиологии НАН Беларуси, 246007, Гомель, ул. Федюнинского, 4; тел.: +375-172-637184, факс: + 375-0232-570706, эл. почта: ehporoff@mail.ru
²МГЭУ им. А.Д. Сахарова, 220009, Минск, ул. Долгобродская, 23; тел.: +375-172-305414, факс: +375-172-306897, эл. почта: ankapich@iseu.by

В микроалiquотах образцов сыворотки крови человека методом радиолигандного анализа с использованием [³H]-5- α -дигидротестостерона исследовали молекулярные характеристики тестостерон-связывающего глобулина (TeCG). В зависимости от экспериментальных условий TeCG продемонстрировал высокую степень конформационной пластичности и способность принимать три состояния (олиго-, ди и мономерные формы) с различными функциональными активностями. Параметры TeCG крови претерпевают существенные изменения в зависимости от физиологического состояния организма, а также после негативных внешних воздействий, что, в частности, показано после аварии на Чернобыльской АЭС у обследованных детей из радиоэкологически неблагоприятных районов. Препараты липиднополиенового комплекса (ЛПК), выделенного из мицелия базидиального гриба *Laetiporus sulphureus*, проявили способность *in vitro* восстанавливать высокую степень сродства и позитивную кооперативность взаимодействия TeCG со своим андрогеном-лигандом, что может явиться основой для разработки нового высокоэффективного метода фармакокоррекции гормон-транспортных характеристик крови, нарушенных при репродуктивных дисфункциях.

Ключевые слова: тестостерон-связывающий глобулин; липиднополиеновый комплекс *Laetiporus sulphureus*.

ВВЕДЕНИЕ. Необходимость преодоления негативных последствий аварии на Чернобыльской АЭС сделала актуальной расшифровку механизмов действия относительно малых (5-100 сГр) доз ионизирующих излучений (ИИ) на функционирование стероид-специфичных белков, в частности, тестостерон-связывающего глобулина (TeCG). Дело в том, что к настоящему времени констатируются различные отклонения и нарушения полового развития у детского и подросткового населения республики, пострадавшего от радионуклидного загрязнения места жительства [1, 2], а измеряемые параметры TeCG рассматриваются как важные показатели, отражающие регуляцию в организме процессов, зависящих от половых гормонов, в том числе в качестве молекулярных маркеров состояния репродуктивной функции [3]. Функциями TeCG являются транспорт низкомолекулярных стероидных гормонов андрогенов в ткани-мишени и контроль их клиренса [4]. Кроме того, накоплен ряд экспериментальных данных о дополнительной физиологической роли TeCG в качестве активатора аденилатциклазной системы мембран андрогенчувствительных клеток [5]. Целью настоящей работы стало исследование молекулярных характеристик и некоторых свойств TeCG, его способностей к конформационно-кооперативным перестройкам в различных условиях, изучение возможностей их коррекции и регуляции.

* - адресат для переписки

СВОЙСТВА ТЕСТОСТЕРОН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛОБУЛИНА КРОВИ

МЕТОДИКА. В работе использовали: 5- α -дигидро-/1,2,6,7-[$^3\text{H}_4$]/-тестостерон ($^3\text{[H]}$ -ДТ; удельная активность 2760 ТБк/моль) ("Изотоп", Россия); тестостерон (Т), 5- α -дигидротестостерон (ДТ), эстрадиол-17 β (E_2), прогестерон (П), дезоксикортикостерон (ДК), триамцинолонацетонид (ТА), голубой декстран, трис(гидроксиметил)аминометан (трис-НСI), набор маркерных белков с известной молекулярной массой "MS-II" ("Serva", Германия); метилтриенолон (R1881) ("NEN", США); аprotинин, активированный уголь Norit A, декстран T70 ("Sigma", США); сцинтилляционную жидкость ЖС-8 ("Монокристаллреактив", Украина) и другие реактивы марки "х.ч."

Проверку радиохимической чистоты меченых андрогенов проводили методом тонкослойной хроматографии на силуфоле в системах, рекомендованных изготовителем, в том числе в системе "хлороформ/метанол/этилацетат" (70:10:30).

Анализ гормон-связывающих характеристик ТеСГ. Ранее установлено, что в крови основным белком, специфически и с высоким сродством взаимодействующим с молекулами E_2 , является эстроген-связывающий гликопротеин (ЕСГ), который по своим физико-химическим свойствам существенно отличается от другого секс-стероид-связывающего гликопротеина (ССГ) крови – ТеСГ, причём, ЕСГ практически не взаимодействует с $^3\text{[H]}$ -ДТ; также ТеСГ с меньшим на два порядка сродством связывает молекулы E_2 [6]. Эти особенности позволили нам применять лиганды $^3\text{[H]}$ -ДТ для определения характеристик именно ТеСГ.

Образцы сыворотки крови 276 детей и подростков получены (8.00) в ходе стандартных медицинских обследований пациентов в 1988-1997 гг. в рамках совместных работ с клиниками НИИ радиационной медицины МЗ РБ (Аксаковщина), МФ БелНИИ экологической и профессиональной патологии МЗ РБ (Могилев) и спецдиспансером ВФ НИКИ радиационной медицины и эндокринологии МЗ РБ (Витебск).

Сыворотку подвергали анализу сразу или помещали в пробирки типа "Эппендорф", замораживали в жидком азоте и хранили при -50°C до использования.

Проведённые оценки временной динамики взаимодействий ТеСГ с андрогеном-лигандом $^3\text{[H]}$ -ДТ при разных температурах инкубации и определения количественных и качественных характеристик ТеСГ в изучаемых образцах плазмы и сыворотки крови показали идентичность результатов при использовании их непосредственно, а также при однократном замораживании/оттаивании и позволили оптимизировать рутинные процедуры анализа характеристик данного гликопротеина. Был выбран следующий стандарт измерений для полноты определения концентрации ТеСГ: аликвоты образцов сыворотки (после освобождения от эндогенного гормона обработкой 15 мин декстран-покрытым активированным углем в 2,0 мл буфера (20 мМ трис-НСI, 10% глицерин, aprotinin – 10^5 МЕ/л, рН 7,4) выдерживали 12 мин при 24°C с ^3H -ДТ (для насыщения ТеСГ гормоном) в диапазоне "физиологических" концентраций (T_{add}) 0,2-4,0 нМ, и далее инкубировали в течение 90 мин при 4°C (для стабилизации "равновесия" в системе инкубации). Последовательность операций была следующей: в пробирки вносили 1,0 мл буфера, затем 0,1 мл раствора $^3\text{[H]}$ -ДТ в буфере, далее: 0,1 мл буферного раствора - в пробах без подавления специфического связывания $^3\text{[H]}$ -ДТ и 0,1 мл раствора немеченого ДТ (200-кратный избыток) - в пробах с подавлением специфического связывания $^3\text{[H]}$ -ДТ. Реакцию начинали внесением 0,6 мл разведенного образца анализируемой сыворотки крови в буфере. После окончания инкубации несвязавшийся с белками ДТ удаляли при 4°C 3х-мин твердофазной адсорбцией активированным углем Norit A (конечная концентрация 0,5%), покрытым декстраном T70 (9:1), внесением в 1,8 мл инкубационной системы 0,2 мл суспензии активированного угля. Далее уголь осаждали центрифугированием (3 мин, 5000 g), аликвоты надосадка по 500 мкл отбирали во флаконы из безкальиевого стекла, добавляли 10 мл ЖС-8 и измеряли радиоактивность на β -счётчике "Mark-III" ("Tracor Analytic", США). Величины специфического связывания $^3\text{[H]}$ -ДТ-гормона ($B = B_{\text{sp}}$) измеряли как разность

между общим (B_t) и неспецифическим (B_{nsp}) его связыванием в системе. Концентрацию белка определяли по методу Лоури. Концентрации сайтов специфического связывания ТеСГ (B_{max} , М или фмоль/мг белка), равновесные константы диссоциации и ассоциации ($K_d = 1/Ka$, М), а также коэффициенты кооперативности Хилла для ТеСГ-связывания $^3[H]$ -ДТ (η_{Hill}) рассчитывали в координатах Скетчарда и Хилла, как описано в [3, 7].

Гельфильтрация на сефадексе G-200 "Superfine". Для идентификации андроген-белковых комплексов, определения их молекулярной массы и отработки метода их выделения использовали метод гельфильтрации [8]. Приготовленной суспензией гранул сефадекса в 50 мМ фосфатном буфере с 30 мМ КСl и 0,07% NaN_3 (рН 7,4) при соотношении буфер/носитель (1:1,5) заполняли метакриловую колонку (16 мм × 400 мм) фирмы "Reanal" (Венгрия) при температуре 7°C, согласно инструкции производителя. Элюцию проводили при температуре 7°C со скоростью 2 мл/см² в час, что оптимально для разделения белков данным методом. Свободный объем колонки, определенный с помощью голубого декстрана составил 21 мл. Колонку калибровали с помощью набора белков с известной молекулярной массой (каталаза - 239 кДа; альдолаза - 160 кДа; альбумин - 67 кДа; овальбумин - 41 кДа; химотрипсिनоген - 25 кДа; миоглобин - 17,8 кДа; цитохром с - 12 кДа). Аликвоты сыворотки инкубировали с $^3[H]$ -ДТ (50 нМ) с добавлением и без добавления 200-кратного избытка немеченого гормона с конечным разведением сыворотки в 5 раз для повышения эффективности фракционирования. Образцы в объеме 1,2 мкл наносили на колонку и элюировали буфером с помощью перистальтического насоса "НП-1М" (Россия) со скоростью 4 мл/час; для отбора фракций объемом 0,65 мл использовали коллектор фракций "FCC-60" (Чехия). Фракции по 0,5 мл переносили во флаконы и производили подсчет радиоактивности, как описано выше. По результатам строили профили элюции образцов сыворотки, инкубированной с $^3[H]$ -ДТ в присутствии избытка немеченого гормона и без него.

Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ ЭФ) по методу [9] с нашими модификациями применен для анализа наличия андрогенспецифичных белков крови. Предварительно образцы сыворотки крови (после удаления активированным углем эндогенных стероидов) инкубировали с $^3[H]$ -ДТ (70 нМ) в отсутствие или с добавлением 1000-кратного избытка немеченого гормона. Несвязанный стероид удаляли, а алиquotы сыворотки (по 50 мкл) с меченым $^3[H]$ -ДТ-ТеСГ, окрашенные фуксином в растворе сахарозы (для визуального контроля за концентрированием), наносили на гель. ПААГ-ЭФ проводили в вертикальных пластинах (толщина гелей - 3 мм) с помощью прибора "АВГЭ" ("Хийу Калур", Эстония) в течение 15 ч при фиксированном напряжении 30 В при 0°C. Верхний (катодный) электродный буфер – 25 мМ трис-НСl, 192 мМ глицерин, рН 8,3 при 4°C; нижний (анодный) – 25 мМ трис-НСl, рН 8,3 при 4°C. В качестве концентрирующего использовали 5%-ный ПААГ в 0,375 М трис-НСl-буфере (рН 6,8 при 4°C). Разделяющим гелем служил 7,5%-ный ПААГ (ТЕМЕД – 0,2%; акриламид/метиленабисакриламид = 69:1; 10 мМ персульфат аммония; 375 мМ трис-НСl, рН 8,3 при 4°C). После окончания электрофореза полоски геля (фракции) помещали во флаконы для счета радиоактивности, добавляли 1 мл этанола и через 2 часа экстракции считали радиоактивность в 5 мл сцинтилляционной жидкости на "Марк-III". Гели обрабатывали красителем (1% Кумасси R250, 40%-ный метанол, 10%-ная уксусная кислота) 1 ч при 37°C. Отмывку несвязавшегося с белками красителя производили в 10%-ной уксусной кислоте.

*Получение липиднополиенового комплекса (ЛПК) гриба *Laetiporus sulphureus**. Мицелий древоразрушающего базидиального гриба *L. sulphureus* выращивали в глубинной культуре на глюкозопептонной среде в течение 7 суток. Мицелий отделяли от культуральной среды фильтрованием на нейлоновой ткани, промывали дистиллированной водой и замораживали жидким азотом. Для получения ЛПК 10 г замороженного мицелия экстрагировали в течение 1 часа

СВОЙСТВА ТЕСТОСТЕРОН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛОБУЛИНА КРОВИ

200 мл этилового спирта, после чего экстракт отделяли от мицеллия на стеклянном фильтре. Содержание сухих веществ в этанольном экстракте составляло 2,75 мг/мл.

Для анализа результатов применяли вариационно-статистический метод с определением степени достоверности различий между средними величинами (опыт vs контроль). Статистическая обработка данных заключалась в: а) оценке параметричности выборки (критерий Колмогорова-Смирнова); б) в случае параметричности выборок использовался t-критерий Стьюдента; в) в случае непараметричности – критерий Мана-Уитни (Mann-Whitney *U*-test). Обработка данных проводилась с использованием статистических пакетов “EXCEL 2000” и “STATISTICA 6.0”. Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Предварительно проведенные нами измерения показали, что концентрации гликопротеина, специфичные для половых стероидов (TeCG), в сыворотке крови пациентов значительно превосходят таковые свободных молекул Т и ДТ, а максимально высокие концентрации TeCG отмечены для детей 3-6-летнего возраста. Одновременно, возрастной период до 6 лет (как для мальчиков, так и для девочек) характеризуется одинаковым по значениям и в то же время самым низким содержанием андрогенов в крови. Начиная с 13-15 лет уровни [TeCG] у обследованных подростков значительно (в 3-5 раз) снижаются, причем на фоне быстрого увеличения содержания тестостерона, и к 16-18 годам у юношей [Т] возрастает в 4-5 раз, а у девушек в 2-3 раза, что совпадает по срокам с вступлением в пубертатную фазу. Наиболее стабильным в отношении концентраций Т и TeCG является период с 7 до 12 лет, причем параметры TeCG вполне совпадают у обоих полов. В данном возрастном диапазоне достигается окончание препубертата и завершается становление половой системы человека, вступающего затем в период половой зрелости. Поэтому в дальнейшем для анализов были использованы образцы сыворотки крови обследуемых пациентов из зон радиационного контроля именно этого возраста, как наиболее сопоставимые.

Изучение характеристик связывания андрогенов TeCG-протеинами крови у детей 7-12 лет (табл. 1) в начале исследований [3] выявило не только отклонения параметров гормон-белковых взаимодействий (V_{max} , η_{Hill} , K_a) по отношению к контрольным значениям, зависящие от уровней радиационного загрязнения районов проживания обследуемых, но и способности этих белков к конформационным изменениям.

Таблица 1. Различия характеристик тестостерон-связывающего гликопротеина (TeCG) сыворотки крови при взаимодействии с ^3H -ДТ у детей 7-12 - летнего возраста, подвергшихся радиационным воздействиям в результате аварии на ЧАЭС.

Параметры TeCG	Группы обследованных пациентов				
	1	2	3	4	5
η_{Hill}	1,82±0,05	1,21±0,07*	1,12±0,03*	1,48±0,18*	1,32±0,24*
$K_a \times 10^9 \text{ M}^{-1}$	6,78±0,41	1,39±0,18*	1,19±0,24*	1,98±0,46*	2,12±0,54*
$V_{max} \times 10^9 \text{ M}$	68,10±9,45	29,30±3,50*	26,40±2,85*	32,20±7,50*	23,00±4,80*

Примечания: 1 - контрольная группа (Браславский, Минский и Столбцовский р-ны); 2 - группа с патологией ЩЖ, с ее облучением в дозах 0,3-0,7 Гр (Наровлянский и Комаринский р-ны); 3 - группа с патологией ЩЖ, с её облучением в дозах 1,0-2,2 Гр (Брагинский и Хойникский р-ны с загрязнением по ^{137}Cs до 556 кБк/м² [≤ 15 Ки/км²]); 4-я и 5-я группы - проживающие в р-нах Могилевской области с уровнями загрязнения по ^{137}Cs до 185 кБк/м² (≤ 5 Ки/км²) и более. Здесь и в таблицах 2 и 4 представлены средние значения \pm ошибка средней. * - Различия достоверны ($p < 0,05$) по отношению к контролю (1-й группе).

Дальнейшие исследования подтвердили конформационную пластичность данного гликопротеина в экспериментах по оценке эффектов оксигенации (добавлением в образцы крови 0,3% перекиси водорода) и влияния градиента концентрации водородных ионов (рН буферного раствора) на величины V_{max} и V_{nsp} (рис. 1). Эти эксперименты продемонстрировали, что мягкая оксигенация инкубационной системы сопровождалась примерно 20%-ным увеличением коэффициента кооперативности Хилла и некоторым повышением степени сродства ТеСГ к $^3[H]$ -ДТ с оптимумом андроген-связывающей способности в диапазоне рН 8-10. Результаты изучения влияния на характеристики ТеСГ кратности разведения сыворотки крови (метод дилуции) с последующей обработкой данных в координатах Скетчарда и Хилла (табл. 2) указывают на "скрытые" функциональные резервы гормонального связывания у данного гликопротеина. Они объясняются, согласно Levitzky и Koshland [7], существованием (идентичных по аминокислотному составу, но разных по степени комплексования) форм белков, проявляющих соответственно разную степень кооперативности белковых субъединиц при связывании лигандов, а именно, мономерные ($\eta_{Hill} < 1,5$), димерные ($\eta_{Hill} = 1,8-2,1$) и олигомерные ($\eta_{Hill} > 2,2$), причём, чем больше величина η_{Hill} , тем больше облегчается (и ускоряется) присоединение новой молекулы лиганда к предсуществующему комплексу, в данном случае: $^3[H]$ -ДТ + ТеСГ-ТеСГ- $^3[H]$ -ДТ. Так как разведение сыворотки сопровождается увеличением V_{max} вдвое, то мы предполагаем, что это происходит за счет раскрытия ранее экранированных сайтов посадки гормона в димерах молекул ТеСГ (возможно, что димеризация сопровождается искажением андроген-связывающего участка в одной из субъединиц).

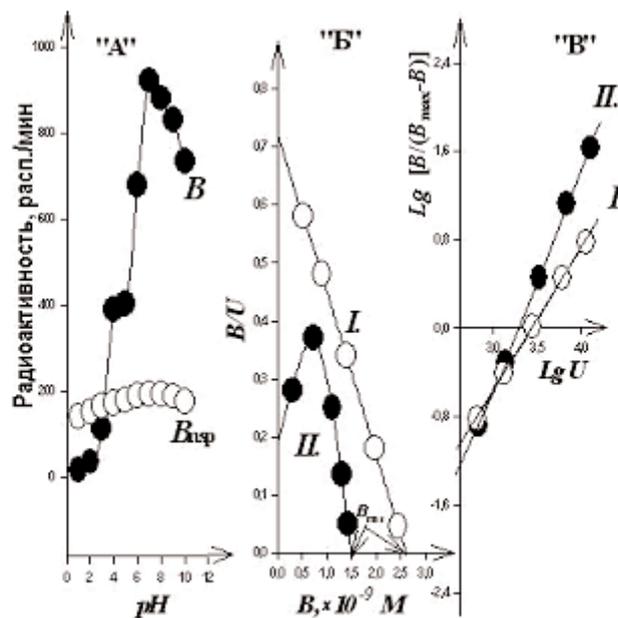


Рисунок 1.

Влияние изменений рН среды на свойства ТеСГ крови человека

Обозначения: "А" - зависимость специфического (В) и неспецифического (V_{nsp}) связывания $^3[H]$ -ДТ (4,22 нМ) с ТеСГ от концентрации водородных ионов. Концентрация белка = 0,99 мг/мл.

"Б" и "В" - эффект H_2O_2 (0,3%) на связывание $^3[H]$ -ДТ с ТеСГ в координатах Скетчарда и Хилла:

U - несвязанный $^3[H]$ -ДТ (T_{add} -B), $T_{add} = 0,20-4,22$ нМ.

I - контроль, II - опыт.

СВОЙСТВА ТЕСТОСТЕРОН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛОБУЛИНА КРОВИ

Таблица 2. Влияние разведения на молекулярные характеристики специфического связывания ^3H -ДТ тестостерон-связывающим гликопротеином (ТеСГ) сыворотки крови человека.

Характеристики	Конечная степень разведения сыворотки крови					
	: 4	: 8	: 25	: 50	: 100	: 200
pK_{50}	2,50±0,18	2,32±0,29	1,93±0,14*	1,10±0,17*	1,03±0,19*	0,91±0,22*
$K_d \times 10^9 \text{ M}^{-1}$	7,24±0,12	7,16±0,14	6,31±0,94	6,24±0,91	3,83±0,80*	3,11±0,65*
$B_{\text{max}} \times 10^9 \text{ M}$	68,28±8,43	68,45±7,36	74,98±8,28	84,59±6,44*	128,64±18,40*	147,42±21,85*

Примечание: * - Различия достоверны ($p < 0,05$ при $n = 12$) по отношению к исходной сыворотке (: 4).

Хроматографический анализ образцов сыворотки крови на метакриловой колонке с сефадексом G-200 (рис. 2) выявил фракции олиго- (пик I), ди- (пик II) и мономера (пик III) ТеСГ. Калибровка колонки маркерными белками MS-II позволила определить молекулярные массы ТеСГ-форм соответственно равными 214 кДа, 107 кДа и 43-54 кДа.

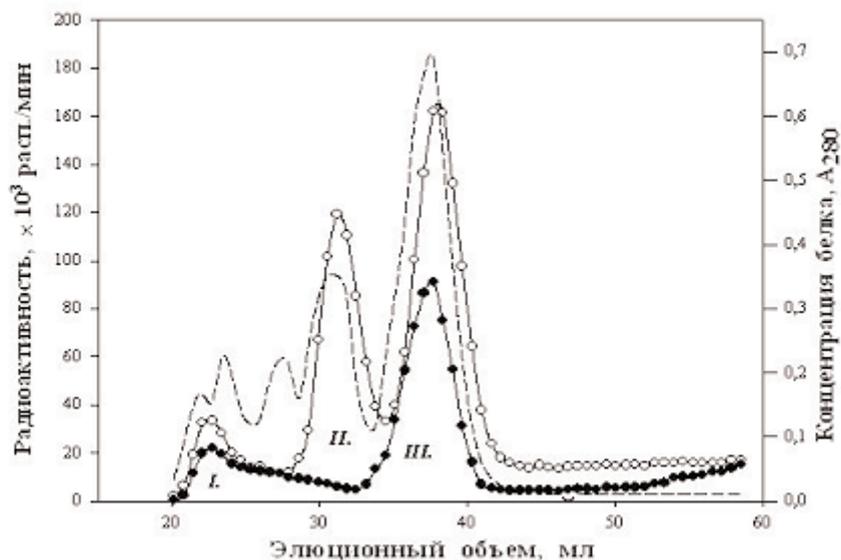


Рисунок 2.

Гель-хроматографический анализ сыворотки крови человека после предварительной её инкубации с ^3H -ДТ, на колонке с Sephadex G-200 Superfine.

Обозначения: -○-○- без добавления избытка немеченого гормона ;
 -●-●- с добавлением избытка немеченого гормона; - - - - профиль элюции белка.

Анализы стероидспецифичности связывания андрогенов во фракциях подтверждают наличие ТеСГ (табл. 3) в каждом из 3-х первых пиков и также свидетельствуют о присутствии секс-стероидсвязывающего глобулина в формах, различающихся по размеру, а, следовательно, степени комплексирования базовых субъединиц [4, 5, 10] данного протеина.

Таблица 3. Анализ стероидспецифичности ТеСГ из пиков I, II и III фракций, выделенных в процессе гельфильтрации нормальной сыворотки человека на колонке с Sephadex-G-200 Superfine (см рис. 2) в присутствии 200-кратных молярных избытков различных немеченых стероидов.

ТеСГ	Ингибирование (% степени подавления) специфического связывания [³ H]-ДТ (2,2 нМ)							
	Т	ДТ	R1881	E ₂	П	ДК	ТА	Х
I-й пик	35,4	100	0,2	1,6	0,2	0,1	0,1	< 0,1
II-й пик	34,8	100	0,2	1,7	0,2	0,1	0,1	< 0,1
III-й пик	35,1	100	0,2	1,7	0,2	0,1	0,1	< 0,1

Аналогичные результаты получены в ходе анализа образцов сыворотки (при помощи электрофореза) в ПААГ при неденатурирующих условиях (пониженная температура, щадящие условия разделения в т.ч. без добавления додецилсульфата натрия и β-меркаптоэтанола). ЭФ-анализ обнаруживает (рис. 3) наличие специфичного к андрогенам белка сыворотки (ТеСГ) в "конформациях" олиго- (188-214 кДа), ди- (94-107 кДа) и мономеров (53,4 и 46 кДа), причём, судя по площади пиков, характеризующих соотношение белка в каждом варианте, можно видеть, что у человека преобладает димерная форма ТеСГ (рис. 3), а у крыс – мономерная (рис. 4).

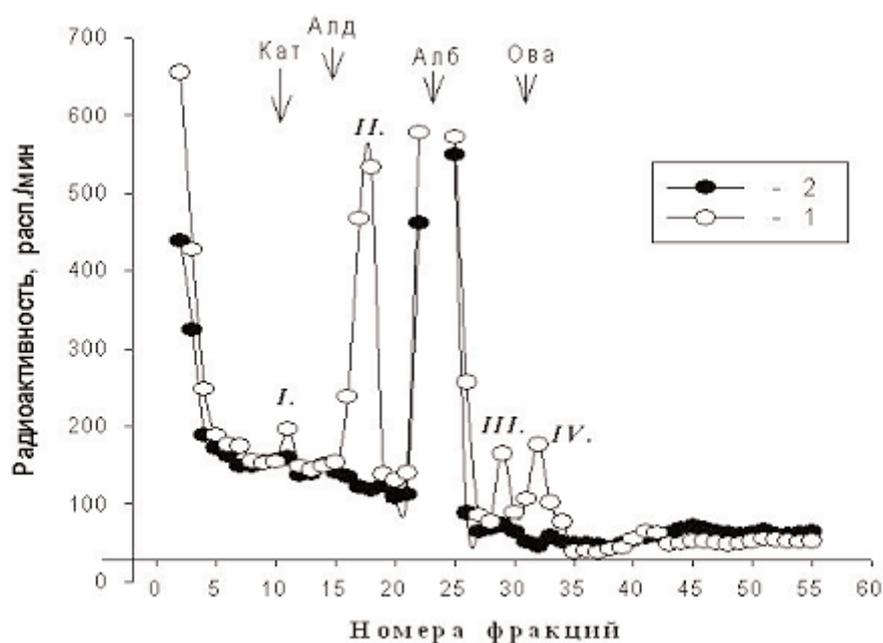


Рисунок 3.

Электрофоретический анализ в полиакриламидном геле белков пула сыворотки крови человека в неденатурирующих условиях после предварительной инкубации с [³H]-ДТ.

Примечание: выявляются I-, II-, III-, IV- формы _hТеСГ: олиго-(188-214 кДа), ди-(94-107 кДа) и мономеры (53,4 и 46 кДа).

Обозначения: 1 - после инкубации с 1000-кратного избытка немеченого ДТ;
2 - без подавления специфического связывания гормона; белки-стандарты: Кат - каталаза (239 кДа);
Алд - альдолаза (160 кДа);
Алб - альбумин (67 кДа); Ова - овальбумин (41 кДа).

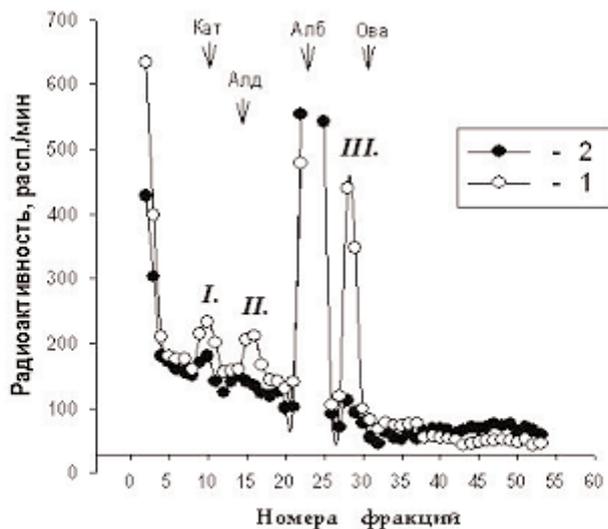


Рисунок 4.

Электрофоретический анализ в полиакриламидном геле белков пула сыворотки крови крысы в неденатурирующих условиях после предварительной инкубации с ^3H -ДТ. Примечание: Выявляются I-, II-, III- формы TeSG : олиго-(212 кДа), ди-(106 кДа) и мономеры (53 кДа). Обозначения: как на рис. 3.

В доступной нам литературе имеются сведения о том, что мономеризация гормонтранспортных белков отмечается при гемосорбции, гиподинамии, гипоксии и лучевых воздействиях [3, 10-15]. Олигомеризация TeSG наблюдается в периоды усиления половой активности у приматов [16, 17]. Существование стероид-транспортных гликопротеинов в моно-, ди- и олигомерных конформационных состояниях продемонстрировано различными методами анализов образцов плазмы, взятых в отличающихся условиях: артериальная и венозная кровь, суточные, сезонные и возрастные особенности [12, 13, 18].

Таким образом, способности к изменению конформационных состояний, судя по динамике величин V_{max} , изменениям кооперативных характеристик (η_{HIII}) сродства (K_a) гормон-специфичных глобулинов крови в отношении их лигандов и другим фактам, – весьма характерны для данных белков.

Рассматривая в связи с этим роль TeSG при целевой доставке андрогенов в ткани и эстафетной передаче их на мембрано-связанную форму андрогеновых рецепторов клеток-мишеней, примем во внимание, что только 2-3% (от общей концентрации) стероидов-андрогенов крови является свободной биологически активной формой; 10-30% их связаны альбумином и орозомукоидом с относительно низким сродством (способны к обмену); лишь оставшиеся 67-88% андрогенов относительно прочно связаны TeSG [1, 11]. Так как общее содержание андрогенов (в основном тестостерона) обычно варьирует в диапазоне 2-4 нг/мл (7-14 нМ), можно рассчитать концентрации обмениваемой и свободной фракций андрогенов: 0,7-3,5 и 0,14-0,42 нМ соответственно. Важно, что экспериментальные значения K_d рецепторов андрогенов плазматических мембран равны

концентрациям свободного тестостерона плазмы крови ($0,23-0,35 \times 10^{-9}$ М), а насыщение гормоном внутриклеточных рецепторов достигается при 1,5-2,5 нМ лиганда, т.е. в диапазоне концентраций обмениваемой формы андрогенов [19]. Необходимо отметить физиологическую роль ТеСГ-стероидного комплекса, как пептидного гормона, узнаваемого специализированными акцепторами на поверхности клеток-мишеней, как триггера, запускающего работу их аденилатциклазных систем, обеспечивающих внегеномные эффекты активации метаболизма в тканях [4, 20, 21]. Все это имеет непосредственное отношение к работе стероид-транспортной системы крови. Так, в нормальных условиях работа андроген-рецепторных систем клеток обеспечивается свободной и обмениваемой фракциями гормонов. Однако в некоторых случаях, например, при фармакологическом увеличении концентрации стероидов, могут наблюдаться онкогенез печени и ускоренное "одряхление" организма (в частности, спортсменов после приема анаболических андрогенов) [22]. В таких ситуациях дополнительная секреция в кровь, деолигомеризация молекул ТеСГ и открытие добавочных сайтов связывания гормона играют роль механизмов, блокирующих "злокачественные" эффекты избытка андрогенов.

Вероятно, что природный механизм регуляции функциональных свойств ТеСГ осуществляется периодическим выбросом в кровяное русло факторов ди-, олиго- и мономеризации (DF, OF, MF). Олигомеризация ТеСГ обеспечивает максимальную доступность андрогенов для внутриклеточных рецепторных систем. Димеры ТеСГ активируют аденилатциклазные системы и контролируемые ими каскады биохимических реакций клеток [5, 10, 20]. Мономеры ТеСГ демпферируют (тормозят) поступление стероидного сигнала в ткани [4, 17]. Источниками факторов регуляции являются клетки тканей-мишеней и гипоталамо-гипофизарные центры [23].

Так как при радиационном поражении, старении и некоторых заболеваниях в организме человека происходят нарушения кооперативных свойств и других характеристик белков гормонтранспортных систем [4, 12-15], то представляется актуальной разработка эффективных методов их коррекции. В связи с этим думается интересны результаты проведенных нами экспериментов *in vitro* по модификации характеристик специфических взаимодействий ТеСГ + $^3\text{[H]}$ -ДТ, в частности, полученные при добавлении в среду инкубации препаратов ЛПК (липиднополиенового комплекса), выделенных из мицелия базидиального гриба *Laetiporus sulphureus* (табл. 4). Липидные компоненты ЛПК *L. sulphureus* представлены нейтральными липидами и фосфолипидами, содержащими в качестве преобладающих жирных кислот линолевою (78,5%), олеиновую (6,8%) и пальмитиновую (14,6%) кислоты. Кроме того, *L. sulphureus* включает полисахариды с антиканцерогенными свойствами [24] и уникальные лэтипоровые кислоты - пигменты, имеющие в своем составе от 10 до 12 конъюгированных двойных связей, и придающие мицелию и плодовым телам этого гриба красно-оранжевую окраску [25]. Следует указать, что разведенные в 100- и более раз образцы сыворотки крови содержат мономеризованные ТеСГ-андрогеновые комплексы ($\eta_{\text{Hill}} \approx 1$), характеризующиеся относительно высоким сродством к гормону. Увеличение степени разведения с 50 до 300 раз сопровождается уменьшением сродства ТеСГ к лиганду $^3\text{[H]}$ -ДТ (K_a изменяется с 6,22 до $2,63 \times 10^9$ М $^{-1}$). Нестероидный антиандроген гидроксинифтолид (ГНФ) не оказывает существенного влияния на величины η_{Hill} и K_a ТеСГ. Практически не сказывается на свойствах ТеСГ микроколичество самого растворителя, используемого для экстракции "действующего начала". В то же время микроколичества этанольного экстракта ЛПК при добавлении в среду инкубации сыворотки с гормоном достоверно увеличивают степень сродства (K_a) и позитивную кооперативность (η_{Hill}) взаимодействия ТеСГ со своим андрогеном-лигандом, тем самым, нормализуя гормонтранспортные характеристики крови.

СВОЙСТВА ТЕСТОСТЕРОН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ГЛОБУЛИНА КРОВИ

Таблица 4. Влияние липиднополиенового комплекса (ЛПК) мицелия гриба *Laetiporus sulphureus* на андроген-связывающие характеристики ТеСГ сыворотки крови человека.

Воздействия		$[^3\text{H}]$ -ДГ-связывающие характеристики ТеСГ		
Разведения сыворотки	Условия анализа	η_{Hill}	$K_a \times 10^9 \text{ M}^{-1}$	$B_{\text{max}} \times 10^9 \text{ M}^\#$
: 4	Контроль 1	2,50±0,18	7,24±0,12	68,28±8,43
	Контроль 2 (без растворителя)	0,98±0,24	6,22±0,45	83,34±9,44
: 50	Контроль 3 (ЭТЛ, 10,00 мкг/мл)	1,01±0,22	6,13±0,18	86,52±6,04
	ЛПК, 2,22 мкг/мл	1,83±0,14*	6,38±0,32	71,36±8,15
	ЛПК, 4,44 мкг/мл	2,07±0,12*	6,54±0,86	70,18±9,22
	Контроль	1,03±0,15	3,83±0,80	128,38±25,47
: 100	ЛПК, 2,22 мкг/мл	2,08±0,11*	6,08±0,93*	75,61±8,10*
	ЛПК, 8,88 мкг/мл	2,26±0,08*	6,62±0,82*	72,18±8,04*
	Контроль	1,12±0,17	3,09±0,74	142,25±22,14
: 200	ЛПК, 2,22 мкг/мл	1,76±0,12*	6,06±0,73*	83,44±7,36*
	ЛПК 8,88 мкг/мл	2,20±0,21*	6,10±0,24*	88,16±8,26*
	ГНФ, 500×10 ⁻⁹ М	1,04±0,25	1,95±0,93	146,96±25,40
	Контроль	1,05±0,16	2,63±1,20	147,15±22,36
: 300	ЛПК, 2,22 мкг/мл	1,86±0,23*	5,96±0,81*	85,34±7,62*
	ЛПК, 8,88 мкг/мл	1,92±0,24*	5,94±1,06*	84,68±9,41*
	Контроль	1,05±0,16	2,63±1,20	147,15±22,36

Примечания: ЭТЛ - этанол, ЛПК - исходный этанольный экстракт мицелия, ГНФ - нестероидный антиандроген гидроксинифтолид. # B_{max} - рассчитаны с учетом разведения сыворотки; другие обозначения - как в таблице 1. * - Различия достоверны по отношению к контролю, $p < 0,05$ ($n = 12$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Таким образом, результаты исследований указывают на возможности новых подходов к разработке методов фармакологической коррекции ТеСГ-зависимой гормональной регуляции, которые основываются не только на дозово-количественных, но и на конформационных эффектах воздействия. Выводы авторов:

1. ТеСГ крови человека обладает высокой конформационной пластичностью и способен взаимодействовать с половыми стероидными гормонами в формах моно-, ди- и олигомеров.

2. Каждая из 3 конформационных форм ТеСГ крови человека имеет свою индивидуальную функцию и физиологическую роль.

3. У пациентов (7-12 лет) из зон радионуклидного загрязнения Могилевской и Гомельской областей, получивших после Чернобыльского взрыва в результате йодного периода на ЩЖ дозы облучения 0,3-2,2 Гр, наблюдаются изменения молекулярных характеристик ТеСГ, проявляющиеся снижением позитивной кооперативности лиганд-белкового взаимодействия (η_{Hill} – в 1,2-1,6 раза), а также уменьшением содержания (B_{max} – в 2,1-3,0 раз) и степени сродства к гормону (K_a – в 3,3-5,7 раз).

4. Существует возможность фармакологической коррекции молекулярных характеристик ТеСГ крови человека, в частности, показана фармакокоррекция девиаций молекулярных характеристик ТеСГ крови человека препаратом ЛПК - липиднополиеновым комплексом из мицелия гриба *Laetiporus sulphureus*, позволяющая восстановить его исходные параметры высокого сродства и позитивной кооперативности в отношении связывания гормона-андрогена.

Авторы выражают благодарность доктору мед. наук, профессору, академику Е.Ф. Конопле за ценные замечания при оформлении рукописи, А.Д. Наумову и Г.Н. Фильченкову за обеспечение клиническими образцами сыворотки крови, А.А. Веевнику, М.А. Гаврилину, А.В. Житковичу, Л.Ф. Клундуку и другим сотрудникам Института радиобиологии НАН Беларуси за техническую помощь в проведении работы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ломать Л.Н. и др.* (2000) Медико-биологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС: Аналитико-информ. бюл., **5**, (1), 12-39.
2. *Леонова Т.А., Маркова С.В.* (1999) Экологическая антропология, **2**, (1), 250-253.
3. *Конопля Е.Ф., Фильченков Г.Н., Попов Е.Г. и др.* (1992) Радиобиология, **32**(4), 488-492.
4. *Siiteri P.K., Murai J.T., Hammond G.L. et al.* (1982) Recent Progr. Horm. Res., **38**, 457-510.
5. *Nakhla A.M., Leonard J., Hryb D.J., Rosner W.* (1999) Steroids, **64**, (3), 213-216.
6. *O'Brien T.J., Higashi M., Kanasugi W.E.* (1982) J. Clin. Endocrinol. Metabol., **54**, 793-797.
7. *Levitzki A., Koshland D.E.* (1976) Curr. Topics in Cell. Regulation, **10**, 2-38.
8. *Остерман Л.А.* (1985) Хроматография белков и нуклеиновых кислот. - М.: Наука.
9. *Ritzen E.M., French F.S., Weddington S.C. et al.* (1974) J. Biol. Chem., **249**, 6597-6604.
10. *Hammond G.L., Bocchinfuso W.P.* (1995) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **53**, 543-552.
11. *Hilpert J., Vorum H., Burmeister R., et al.* (2001) Biochem. J., **360**, 609-615.
12. *Moore J.W., Bulbrook R.D.* (1988) Oxford Rev. Reprod. Biol., **10**, 181-236.
13. *Конопля Е.Ф., Фильченков Г.Н.* (1989) Вопр. мед. химии., **35**, (5), 40-45.
14. *Pugeat M., Crave J.C., Elmidani M. et al.* (1991) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **40**, 841-849.
15. *Zwirka-Korcza K., Ostrowska Z., Buntner B.* (1992) Wiad-Lek., **45**(17), 711-714.
16. *Koritnik D.R., Marschke K.B.* (1986) J. Steroid. Biochem., **25**, 135-141.
17. *Perret M.* (1986) J. Endocr. **110**, 169-175.
18. *Damassa D., Gustafson A., Kweiecinski G. et al.* (1995) Am. J. Physiol. Regul. Integr., **35**, 1303-1309.
19. *Konoplya E.F., Popoff E.H.* (1992) Int. J. Biol. Chem., **24**, 1979-1983.
20. *Porto C.S., Lazari M.F.M., Abreu L.C. et al.* (1995) J. Steroid Biochem. Mol. Biol., **53**, 561-565.
21. *Heinlein C.A., Chang C.* (2002) Molecular Endocrinology, **16**, 2181-2187.
22. *Hernandes-Niete L., Burguera M., Bombi J.A.* (1977) Cancer, **40**, 1761-1764.
23. *Розен В.Б.* (1994) Основы эндокринологии. - М.: МГУ.
24. *Zjawiony J.K.* (2004) J. Nat. Prod., **67**, 300-310.
25. *Davoli P., Mucci A., Schenetti L., Weber R.* (2005) Phytochemistry, **66**, 817-823.

Поступила: 05. 09. 2007.

MOLECULAR CHARACTERISTICS OF TESTOSTERONE BINDING GLOBULIN AND
ANALYSIS OF THEIR REGULATION

E.H. Popoff¹, A.N. Kapich²

¹Institute of Radiobiology, Belarus Nat. Acad. Sci., Feduninskogo ul., 4., Gomel, 246007 Belarus;
tel.: 2682640; fax: + 375-(0232)-57-07-06; e-mail: ehpopoff@mail.ru

²International Sakharov Environmental University, Dolgobrodskaja ul., 23, Minsk, 220009 Belarus;
tel.: +375-172-305414; fax: +375-172-306897; e-mail: ankapich@iseu.by

Molecular characteristics of testosterone binding globulin (TeBG) were investigated in microaliquots of human serum samples using ³H-5- α -dihydrotestosterone radioligand assays. Under experimental conditions used TeBG demonstrated high conformational plasticity and ability to adopt three conformational states (olygo-, di-, and monomer) with different functional activities. Using a lipidpolyene complex from basidiomycete *Laetiporus sulphureus* we demonstrate a novel effective pharmacological correction of the TeBG characteristics.

Key words: testosterone binding globulin, lipidpolyene complex of *Laetiporus sulphureus*.