

© П.П.ГОЛИКОВ  
УДК — 577.175.53

## **РЕЦЕПТОРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО И АНТИГЛЮКОКОРТИКОИДНОГО ЭФФЕКТА**

**П.П.ГОЛИКОВ**

НИИ скорой помощи им.Н.В.Склифосовского, Москва, 129010, Б.Сухаревская, 3

Проведен анализ рецепторных механизмов реализации глюкокортикоидного и антиглюкокортикоидного эффекта. Лимитирующим звеном в реализации глюкокортикоидного и антиглюкокортикоидного эффекта являются специфические цитоплазматические глюкокортикоидные рецепторы (ГР), функция которых контролируется белками теплового шока (БТШ) молекулярной массы 90 кД. Под

влиянием глюкокортикоидов (Г) высвобождаются из комплекса ГР-БТШ, образуя комплексы ГР-Г. Последние транслируются в ядро клетки, активируют функцию генетического аппарата, изменяют биосинтез специфических ферментов, реализующих внутриклеточный глюкокортикоидный эффект. Рецепторный механизм антиглюкокортикоидного эффекта реализуется путем конкуренции стероидных и нестероидных препаратов с глюкокортикоидами за места связывания на ГР или фармакологической стабилизации комплекса ГР-БТШ, понижающей высвобождение 4sГР, образование 4sГР-Г и транслацию 4sГР-Г в ядро клетки. Изысканию антиглюкокортикоидов способствуют новые данные о химической структуре ГР, согласно которым ГР содержат 3 функциональных домена, характеризующиеся регуляторной, ДНК-связывающей и лигандсвязывающей активностью. Это способствовало синтезу нового наиболее активного рецепторного антиглюкокортикоида RU-486 (19-норстероид), который ингибирует синтез овальбумина и кональбумина, индуцированный глюкокортикоидами.

Глюкокортикоидные рецепторы (ГР) являются лигандсвязывающими факторами транскрипции [8, 33]. Синтез ГР программируется одним геном 5 хромосомы [35]. Непосредственный биосинтез ГР происходит в эндоплазматическом ретикуле цитоплазмы [8]. В цитоплазме ГР связываются с белками теплового шока (БТШ, шапероновые белки) с молекулярной массой 90, 70, 50 КД [16, 56]. Молекулярный вес комплекса БТШ-ГР составляет более 300 КД. В отсутствие глюкокортикоидов ГР локализованы преимущественно в цитоплазме [24, 71]. В одной клетке содержится от 5000 до 100000 специфических ГР.

В физиологических условиях связывание стероидного гормона с рецептором приводит к диссоциации БТШ из рецептора и димеризации рецептора [49]. Активированный ГР человека имеет следующую физико-химическую характеристику: молекулярная масса 94 КДа [75]; 777 аминокислот [35]; коэффициент седиментации 4S [75]; кислый белок, рН 5,7 [50]; длина молекулы 0,13 нм [22]; отрицательный заряд [48]; фосфопротеин [48]; одна молекула глюкокортикоидного апорепректора связывает одну молекулу глюкокортикоидного гормона [9].

Если рассматривать структурные свойства в терминах модификаций прогестеронового скелета, то следующие изменения приводят к повышению сродства стероида к ГР: восстановление 4,5 или 1,2 двойной связи; 9-флюоро-или 6-метиловой групп; С-17 боковой цепи; гидроксильных групп в положениях 11, 17 и 21; С-3 и С-20 кетогрупп. Кроме того, существенную роль при этом оказывает наличие определенных 16- и 17-заместителей [2, 6].

Пути, по которым такие изменения влияют на сродство стероида к ГР, понятны частично. Связыванием рецепторов включает гидрофобный контакт между поверхностью стероидной молекулы и рецепторным белком. Удаление гидрофильной воды из стероида посредством гормонрецепторного взаимодействия, вероятно, является основной движущей силой этой реакции связывания. Сродство также увеличивается присутствием ключевых гидроксильных групп, которые образуют водородные связи с определенными аминокислотами в рецепторе [2].

Важные сведения о функциональных свойствах ГР получены при изучении химической структуры этих рецепторов [57]. С помощью деградации ГР протеазой [73, 74], а позже путем сайт-направленного мутагенеза [23, 50] было установлено, что ГР содержит 3 функциональных домена.

1. **Аминотерминальный домен** (трансактивационный, N-терминальный, регуляторный, иммуногенный) трансактивирует транскрипцию [26, 67]. Домен трансактивации по природе является кислым, поскольку обогащен такими аминокислотами, как треонин, серин, глутамин и заключен между сетками 77-262 молекулы ГР. Домен трансактивации прямо не взаимодействует с ДНК, однако, является дополнительным вспомогательным фактором транскрипции, способствующим путем стабилизации сборки комплекса прединициации на промоторе увеличению частоты инициации транскрипции. Эта стабилизация является результатом взаимодействия белок-белок между регуляторным фактором транскрипции (домен транскрипции) и одним или более факторами внутри комплекса прединициации [26]. Недавно было установлено взаимодействие между доменом трансактивации и фактором транскрипции AP-I, который состоит из белков c-jun и c-fos [33]. Ген пролиферации имеет на ДНК сложный гормон-реактивный элемент (ГРЭ), который содержит места связывания для AP-I и функционирует как положительный или отрицательный ГРЭ [33].

При наличии c-jun он опосредует положительную глюкокортикоидную регуляцию, в то время как при замещении c-jun на c-fos глюкокортикоиды вызывают отрицательный эффект. Установлено, что ГР ингибирует активность AP-I, взаимодействуя с c-jun

и c-fos и таким образом предотвращает связывание AP-I с ДНК. Возможно, что репрессия активности AP-I является функцией не димеров, а мономеров ГР [33].

Роль фосфорилирования ГР окончательно не установлена [53]. Известно, что фосфорилирование не требуется для функции лигандсвязывающего и ДНК-связывающего доменов. Фосфорилирование Р происходит преимущественно на N-терминальном конце. При этом в пределах трансактивационного региона ГР содержится шесть фосфосериновых и один фосфотреониновый остаток [14, 27, 47]. Фосфорилирование этого региона увеличивается в 2-3 РАЗА после связывания глюкокортикоида, но не антиглюкокортикоида [34]. Очевидно, что стероидзависимое фосфорилирование этого региона играет важную роль в процессах трансактивации.

2. ДНК-связывающий домен (ДСД) молекулы ГР ответственен за специфические ДНК-связывающие активности рецептора. Домен имеет функции слабой димеризации, ядерной локализации и трансактивации. Располагается он в средней части молекулы ГР. Функция димеризации ДСД выявляется ПРИ ОБРАБОТКЕ цитозольного рецептора растворами с высоким содержанием соли в отсутствии глюкокортикоида. При этом происходит диссоциация шапероновых белков и активация специфической ДНК-связывающей способности ГР [49]. Из этого следует, что шапероновые белки маскируют ДНК-связывающий участок рецепторного белка и таким образом блокируют взаимодействие ГР с геномом в отсутствии глюкокортикоидов. Образование димеров увеличивает сродство ГР к их соответствующим ГЭ, преимущественно благодаря увеличению размера контактирующей поверхности с ДНК. Димеризационные взаимодействия идентифицированы внутри ДСД рецепторов [20]. Это взаимодействие опосредовано 5-аминокислотной петлей, близкой с С-терминальному иону цинка [20]. ДНК-связывающий домен ГР состоит из 66-68 аминокислот, содержит 9 консервативных цистеиновых остатков и высокую пропорцию основных аминокислот. Основные аминокислоты образуют электростатические взаимодействия с отрицательно заряженной ДНК, стабилизируя таким образом связывание ГР с ДНК [32]. Расположение цистеиновых остатков напоминает структуру цинкового пальца. При этом ДСД рецептора содержит два иона цинка, тетраэдриально координированные цистеиновыми остатками. Три аминокислоты в альфа-спирали на конце первого цинкового пальца ответственны за узнавание ГРЭ на ДНК [62]. Исследования ДНК-связывающей способности гибридных ГР, сконструированных с помощью последовательностей для молекулы ГР, показали, что N-терминальная часть ДСД содержит детерминанты для распознавания специфической последовательности ДНК [24, 29, 43]. Впоследствии специфические детерминанты были сужены до трех аминокислот, которые локализованы близко к N-терминальному иону цинка на экспонированной к растворителю поверхности распознающей альфа-спирали [62].

3. Карбокси-терминальный домен (С-терминальный) молекулы ГР реализует гормонсвязывающую функцию [27]. Эта часть молекулы ГР также содержит остатки аминокислот, которые взаимодействуют с БТШ, сигналом ядерной локализации, функциями димеризации и активностью транскрипционной трансактивации [28, 36, 54]. Стероидсвязывающий домен распознает специфическую трехмерную конфигурацию. Мечение по сродству глюкокортикоидных рецепторов способствовало идентификации трех различных сегментов в пределах С-терминального домена [16]. Один сегмент, содержащий дис-632 в ГР человека, специфично распознает структуру боковой цепи глюкокортикоидов, так как он может быть мечен по сродству дексаметазон-21-метилатом, ковалентно связывающегося с ГР [16]. Два других сегмента С-терминального домена взаимодействуют со структурой А-кольца глюкокортикоидной стероидной молекулы, поскольку они могут быть мечены по сродству фотоактивацией А-кольца стероида [16]. Каждый из трех сегментов по природе преимущественно гидрофобен. Гидрофобные взаимодействия играют важную роль в связывании глюкокортикоидов, так как стероидсвязывающий домен складывается, образуя гидрофобную глюкокортикоидсвязывающую поверхность. Вставки или точечные мутации в пределах этого домена разрывают связывание стероида [27].

Таким образом, выявленные для каждого из трех доменов ГР функциональные свойства открывают новые возможности в рецепторной регуляции глюкокортикоидного и антиглюкокортикоидного эффекта.

Лигандная активация ГР сопровождается процессом транслокации стероид-рецепторного комплекса в ядро клетки. По мнению ряда авторов, процесс транслокации



контролируется специфическим механизмом [25, 30]. Так, при прохождении крупных молекул белка через оболочку ядра необходим сигнал для ядерной миграции внутри самого ГР и механизм в ядре, реагирующий на сигнал. Обнаружено, что белки ядерной оболочки молекулярной массы 60000 — 76000 КДа взаимодействуют с сигналами ядерной локализации ГР [40]. ГР содержит два независимых сигнала ядерной локализации [52]. Первый сигнал, NL 1, расположен на С-терминальном конце ДНК-связывающего домена (регион “шарнира”). Сигнал функционально репрессирован, когда присутствует стероидсвязывающий домен, но становится существенно активен, когда этот домен ГР усечен [52]. Второй сигнал, NL 2, лежит в пределах стероидсвязывающего домена и отделен от гормонального контроля. Ядерная транслокация ГР достаточно быстрая и составляет  $T_{1/2}$  1-5 мин при 37°C [52].

Интересно, что глюкокортикоиды и ГР способны реализовать эффект через систему микрофиламентов (актина). Так, ГР связывается с актиновыми филаментами посредством БТШ 90 КД [45], а обработка клеток глюкокортикоидами стабилизирует актиновые сети [17, 19]. Таким образом, глюкокортикоидные гормоны трансдуцируют некоторые эффекты на клетки посредством взаимодействия между ГР и внутриклеточным цитоскелетом.

Ключевым вопросом в механизме действия ГР является их избирательность в регуляции активности гена, тесно связанная с первичным действием глюкокортикоидрецепторного комплекса на хроматин. Определенное понимание этих вопросов облегчает аналогия регуляции экспрессии гена циклическим аденозинмонофосфатом (цАМФ) у *E. coli* с действием глюкокортикоидных гормонов у эукариот. Реализация эффекта цАМФ начинается с взаимодействия со специфическим белком CAP или CRP, что сопровождается конформационными изменениями в CRP [76]. Белокнуклеотидный комплекс в состоянии конформационных превращений получает способность связываться с ДНК. В промоторе *lac* оперона, где комплекс CRP-цАМФ стимулирует транскрипцию, сродство комплекса несколько выше, чем его общее сродство с ДНК. Так как число последовательностей непромоторной ДНК превосходит промоторную ДНК более, чем в  $10^4$  раз, возможность связывания данного комплекса с промотором может быть низкой и составлять 1 на 1000 [44]. Тем не менее, регуляция экспрессии гена у бактерий облегчается благодаря высокой концентрации комплексов CRP-цАМФ, вполне достаточной, чтобы обеспечить ассоциацию этих комплексов с промоторной ДНК, несмотря на экстенсивное неспецифическое связывание ДНК с комплексами CRP-цАМФ. Из того следует, что механизм CRP-цАМФ регуляции экспрессии гена у бактерий, действительно, может быть взят за основу в глюкокортикоидрецепторной регуляции экспрессии гена у эукариот.

Большинство эффектов цАМФ у эукариот происходит через активацию протеинкиназ, которые действуют как посттранскрипционные локусы, в то время как способность цАМФ прямо воздействовать на ядро животных клеток не была полностью доказана. Позже появились данные о возможном участии специфических белков цитоплазмы в транслокации цАМФ в ядро клетки [38]. Возможно, этим обстоятельством объясняется сходное действие цАМФ и глюкокортикоидов на многочисленные процессы метаболизма [12].

Особое место в изучении действия глюкокортикоидов на активность генов отводится изменениям хроматина, которые прослеживаются в модельных исследованиях. Обычно такие исследования проводятся в системе, состоящей из экзогенной РНК-нуклеотидилтрансферазы и изолированного хроматина. При этом происходит связывание РНК-полимеразы II с ДНК. Начало синтеза РНК обеспечивается центрами узнавания РНК-полимеразы II и связывания субстрата, одного из четырех трифосфатнуклеозидов. В присутствии рифампицина трифосфатнуклеозидом подавляют активность всех свободных молекул фермента, не образовавших “начальные” комплексы с хроматином. Трифосфатнуклеозид также подавляет реинициацию РНК-нуклеотидилтрансферазы после того, как фермент синтезировал цепь РНК. Таким образом, количество синтезированных транскриптов РНК полностью соответствует числу молекул РНК-нуклеотидилтрансферазы, связавшихся в “начальные” комплексы с хроматином. В условиях организма гормон повышает количество областей с местами, в которых экзогенный фермент, связавшись, может синтезировать РНК, что верифицируется с помощью  $\gamma^{32}$  Р-фосфата [60]. Поскольку группа  $\gamma^{32}$  Р-фосфата в процессе биосинтеза РНК в этих условиях не вводится внутрь, а включается только в 5'-конец цепи РНК, то по



радиоактивности, впоследствии обнаруживаемой в РНК, можно судить о числе синтезированных цепей РНК. Влияние стероидного гормона на этот процесс максимально в первые 30 мин и тесно коррелирует с кинетикой и экстенсивностью гормон-рецепторного связывания. Такой хроматин имеет повышенную способность синтезировать мРНК овальбумина, определяемую с помощью сДНК-РНК гибридизации [66].

Ранее было принято считать, что взаимодействие стероидрецепторного комплекса с хроматином сопровождается стимуляцией связывания одной РНК-нуклеотидилтрансферазы. Это положение вытекало из тесной корреляции между количеством "начальных" мест для фермента на хроматине и числом рецепторов в ядре, из чего следовало, что один рецептор контролирует один ген [15]. Естественно, что доказательство этой гипотезы могло быть получено только при использовании чистых образцов рецепторов. Последующие исследования показали, что очищенные образцы рецепторов имеют такую же активность на хроматине, как и активность рецепторов *in vivo*, что подтверждает возможность существования механизма: один рецептор контролирует один ген. Так, когда очищенные стероидрецепторные комплексы добавляли к хроматину, то происходило повышение числа мест инициации для РНК-нуклеотидилтрансферазы на хроматине и усиление активации транскрипции гена овальбумина [60]. В данном случае эффект рецептора заключался в повышении связывания РНК-нуклеотидилтрансферазы с местами инициации, поскольку добавление рецептора после связывания РНК-полимеразы II не влияло на связывание фермента на хроматине.

Исследования, проведенные на культуре клеток гипофиза, показали, что глюкокортикоиды оказывают влияние на структуру хроматина, изменяя транскрипцию мРНК гормона роста. Обработка клеток гипофиза дексаметазоном стимулирует индукцию гормона роста и ее мРНК [42, 63]. При этом предварительно обработанный гормоном хроматин в присутствии бактериальной РНК-нуклеотидилтрансферазы проявляет максимальную матричную активность. Как при добавлении рифампицина, так и без него [37]. Результаты экспериментов с ингибитором (рифампицин) свидетельствуют о том, что стимуляция матричной активности хроматина связана с влиянием РНК-полимеразы II на инициацию, так как распределение длин цепей РНК было идентично в обработанных и не обработанных гормоном клетках. Это положение нашло подтверждение и в том, что число вновь синтезированных цепей РНК было повышенным, о чем свидетельствует включение  $\gamma^{32}$  Р-ГТФ в РНК. Стимуляция матричной активности хроматина хорошо коррелировала с кинетикой связывания ГР с ядром. Эффект был обратим, и его исчезновение шло параллельно с диссоциацией глюкокортикоида из ядерносвязанного комплекса глюкокортикоид — рецептор [37]. Подмечена тесная взаимосвязь между относительным насыщением рецептора глюкокортикоидными стероидами и матричной активностью хроматина.

Достижения в изучении глюкокортикоидрецепторных механизмов регуляции генетического аппарата клетки явились основой изыскания природных и синтетических глюкокортикоидов. Клинический спрос на такие препараты чрезвычайно высок, поскольку антиглюкокортикоиды могут быть использованы в качестве антистрессорных препаратов. По определению ряда авторов, рецепторные антагонисты глюкокортикоидов не являются лекарственными препаратами в общепринятом понимании, так как они не снижают продукцию стероидов надпочечниками, не вызывают структурные изменения в клетках-мишенях [11]. Их мишенями также не являются биосинтетические механизмы глюкокортикоидов или метаболизм. Не оказывают антиглюкокортикоиды прямого эффекта и на транспорт глюкокортикоидов в циркуляции крови. Антиглюкокортикоиды — это такие препараты, которые связываются с теми же сайтами, что и эндогенный глюкокортикоид, который в присутствии антиглюкокортикоида не может проявлять свой глюкокортикоидный эффект [11]. Отсюда большие ожидания того, что в перспективе будут обнаружены и синтезированы высокоселективные рецепторные антиглюкокортикоиды, в силу селективности обладающие мягким, но терапевтически выраженным эффектом.

Однако аффинные свойства глюкокортикоида не всегда коррелируют с антиглюкокортикоидным действием. Кроме того, антиглюкокортикоид может иметь конкурентное и неконкурентное взаимодействие с ГР [5, 21]. В настоящее время синтезирован ряд трансформированных стероидов, не обладающих выраженным глюкокортикоидным эффектом, но активно конкурирующих с глюкокортикоидами за места связи на ГР [2]. Однако, об антиглюкокортикоидном эффекте этих стероидов судить трудно, поскольку существу-

ет перекрывание специфичности связывания стероидов в пределах подсемейства, состоящего из рецепторов к андрогенам, глюкокортикоидам, минералкортикоидам и прогестерона [65]. Учитывая каскад взаимосвязанных процессов рецепторной реализации глюкокортикоидного эффекта, наряду с конкуренцией за занятые глюкокортикоидом места на рецепторе, антиглюкокортикоиды могут оказывать свое специфическое действие путем ингибирования связывания активированного стероидрецепторного комплекса с ДНК, подавления диссоциации шапероновых белков из гетероолигомерного рецепторного комплекса, затруднения димеризации рецептора. В большей или меньшей степени на все эти звенья рецепторной реализации глюкокортикоидного эффекта антиглюкокортикоиды способны не оказывать определенное влияние. К такому заключению приходит ряд авторов, которые исследовали рецепторные механизмы действия перспективного синтетического антиглюкокортикоида RV 486 [13, 46].

Интерес к изучению этого антиглюкокортикоида резко возрос после того, как было установлено, что RV 486 (19-норстероид) связывается с высоким сродством с ГР яйцевода цыпленка [31] и является антагонистом синтеза овальбумина и кональбумина, индуцированного глюкокортикоидами [61]. Дальнейшее изучение механизма антиглюкокортикоидного эффекта RV 486 показало, что обработка ядер насыщающими концентрациями RV 486 почти не сопровождалась появлением комплекса RV 486-ГР в ядерной фракции, тогда как 80% комплексов ацетонид триамцинолон (АТ)-ГР поглощались ядрами [11]. Поскольку БТШ содержащая форма ГР имеет низкое сродство как с ДНК, так и с ядрами, естественно предположение, что RV 486 не трансформирует 8S ГР в 4S ГР.

При низком содержании соли, независимо от присутствия или отсутствия молибдата натрия, коэффициент седиментации комплексов АТ — ГР и RV 486 — ГР составил 8S, что свидетельствует о присутствии БТШ 90 КД в стероидрецепторных комплексах [55]. БТШ 90 КД являются составной частью большинства, если не всех клеток. Его концентрация составляет 0,1-0,2% циторастворимых белков. Этот белок не связывается с гормонами или ДНК [70]. Небольшая фракция БТШ 90 КД обнаружена в ядре клетки, что и объясняет ядерную локализацию ГР в их нетрансформированной форме (8S) в отсутствие гормона [26, 51]. Комплексы БТШ — ГР образуются сразу же после биосинтеза рецепторов, препятствуя взаимодействию рецептора с ДНК до тех пор, пока не вмешается поступающий в цитоплазму гормон. Исследования с использованием антител против БТШ 90 КД и физико-химический анализ комплекса БТШ 90 КД после диссоциации указывает, что комплекс состоит из рецепторного белка (95 КД) с одной субъединицей и двух субъединиц БТШ 90 КД [69]. Окончательно роль БТШ 90 КД в рецепторном механизме действия не выяснена.

Эксперименты с использованием эксплантатов яйцевода, инкубированных либо с АТ, либо с RV 486 (20 нМ) в течение 1 часа при 37°C, подтвердили результаты, полученные в бесклеточном цитозоле. Так, когда использовали RV 486, 94% общего пула ГР находилось в цитозоле, и 60% его было в виде 8S. Напротив, из 20% общего пула ГР, оставшегося в цитозоле после обработки АТ, почти все 90% были в трансформированной форме 4S [11]. Исследование ДНК-связывающей активности комплекса АТ- и RV 486 — ГР, проведенные в ДНК-целлюлозо-связывающих экспериментах, показали, что экспозиция цитозоля при 25°C в течение 1 часа с АТ или RV 486 не вызывала связывания ГР с ДНК-целлюлозой в присутствии стабилизатора гетероолигомерной формы ГР молибтата натрия. В отсутствие молибтата натрия связывание АТ — ГР с ДНК-целлюлозой было в 5 раз выше, чем RV 486-ГР. Хотя под влиянием RV 486 было диссоциировано небольшое количество 4S форм ГР, с помощью ультрацентрифугирования было получено достаточное количество 4S формы ГР для проведения сравнительного связывания на ДНК-целлюлозе 4S форм ГР, полученных путем цитозоля АТ и RV 486. Результаты оказались неожиданными: комплексы АТ- и RV 486 — ГР одинаково связывались с ДНК-целлюлозой [10, 72].

Таким образом, в отличие от агониста АТ, который способствует трансформации рецептора и выделению активной единицы 94 КД ГР, RV 486 стабилизирует 8S нетрансформированную форму ГР, предотвращая его взаимодействие с гормончувствительным механизмом ДНК. Эти данные представляют интерес не только для объяснения механизма антиглюкокортикоидного эффекта RV 486, но и неожиданно открыли важнейшую функцию БТШ 90 КД в рецепторной регуляции глюкокортикоидного эффекта. Не вызывает сомнения, что БТШ 90 КД являются факторами, выполняющими



функцию регулятора транскрипции, которые сами по себе не связываются с ДНК, по препятствуют связыванию с ДНК нетрансформированных 8S форм ГР [18, 58].

Учитывая многоступенчатый механизм молекулярных событий в реализации рецепторного глюкокортикоидного эффекта и недостаточную изученность факторов транскрипции и хроматиновых структур, заинтересованных в кооперативных связях с ГР, была предложена концепция, включающая четырехступенчатый анализ в механизме действия антиглюкокортикоидов на рецепторном уровне [11].

1. Антиглюкокортикоиды могут стабилизировать гетероолигомер 8S, предотвращая выделение активированного ГР.

2. За связыванием антиглюкокортикоидов с 8S может следовать выделение антиглюкокортикоид — 4S рецепторных комплексов с высоким сродством к неспецифичной ДНК. Это может снижать доступность активированных ГР для связывания с ГРЭ, которые запускают гормональный ответ.

3. Антиглюкокортикоид-4S рецепторные комплексы могут иметь сниженную аффинность к ГРЭ по сравнению с комплексами глюкокортикоид — рецептор, что приводит к снижению гормональной реакции.

4. Комплексы антиглюкокортикоид-4S-рецептор, выделившийся из 8S комплексов, идентично комплексам глюкокортикоид-4S-рецептор, взаимодействуют как со специфической, так и с неспецифической ДНК. Но эти комплексы не могут взаимодействовать из-за помех, обусловленных факторами хроматина.

Предложенная концепция молекулярного механизма действия антиглюкокортикоидов на рецепторном уровне основана на результатах исследований антиглюкокортикоидного эффекта RV 486 [11].

В настоящее время появились данные о влиянии нестероидных соединений на функцию глюкокортикоидных рецепторов [39, 41, 68]. Установлено, что ненасыщенные жирные кислоты проявляют неконкурентный тип ингибирования функции глюкокортикоидных рецепторов. При этом ненасыщенные жирные кислоты взаимодействуют в сайте рецептора, отличающемся от сайта связывания глюкокортикоидов. Связывание ненасыщенных жирных кислот со вторым сайтом ГР сильно изменяет конформацию гормонсвязывающего сайта ГР [68].

Влияние нестероидных препаратов на функцию ГР неоднозначно. Одни препараты (анальгин, салицилат натрия) снижают плотность ГР II *pbgf* (истинные ГР) и константу взаимодействия и одновременно увеличивают плотность ГР III типа [5]. Увеличение глюкокортикоидсвязывающей способности ГР III типа снижает функцию ГР II типа путем снижения концентрации свободного глюкокортикоида в клеточной системе [1]. Следовательно, повышение плотности ГР III типа препятствует реализации глюкокортикоидного эффекта и обеспечивает таким образом антиглюкокортикоидный эффект.

Другие нестероидные препараты (морфанол), наоборот, увеличивают плотность ГР II типа и снижают плотность ГР III типа. Очевидно, что повышение плотности ГР-II и снижение плотности ГР-III действуют однонаправленно на увеличение глюкокортикоидного эффекта [5]. Выраженное действие на функцию ГР II типа проявляют препараты фенотиазинового ряда (аминазин, тизерцин, френолон) [3]. Пенициллин С, стрептомицин, цефазолин, относящиеся к различным группам антимикробного действия, многократно увеличивают плотность ГР III типа [4]. Исследование механизма ингибирующего действия нестероидных препаратов на функцию ГР II типа с помощью анализа Лайнуивера-Берка показало, что анальгин и другие препараты, подобно ненасыщенным жирным кислотам, ингибируют функцию ГР II типа по смешанному неконкурентному типу [5]. Можно полагать, что, как и ненасыщенные жирные кислоты, нестероидные препараты способны ингибировать функцию ГР II типа путем взаимодействия с локусом, расположенным вне специфического места связывания гормона ГР II типа. На возможность существования другого локуса, расположенного вне пределов специфического гормонсвязывающего локуса ГР II типа, указывает в своих исследованиях ряд авторов [5, 64].

Обращает на себя внимание то, что изменение функции ГР III типа происходит под влиянием значительно более низких концентраций нестероидных препаратов, чем изменение функции ГР II типа [5]. По-видимому, это является чрезвычайно важным моментом в фармакологической регуляции глюкокортикоидного эффекта.

Изучение влияния нестероидных препаратов на функцию ГР II типа проведено на гетероолигомерной форме рецептора [5]. Можно было полагать, что при диссоциации



БТШ из комплекса БТШ — ГР II типа ингибирующий эффект нестероидных препаратов на функцию активированной формы ГР II типа будет утрачен. Однако исследования показали, что нестероидные препараты ингибируют функцию не только гетероолигомерной, но олигомерной формы ГР II типа [68]. Несмотря на то, что основная роль в связывании лиганда принадлежит С-терминальному лиганду ГР II типа, пока не представляется возможным утверждать, что нестероидные препараты реализуют свой эффект исключительно через этот домен, так как местоположения неспецифического локуса могут быть и за пределами С-терминального локуса.

В заключение следует отметить, что в изучении рецепторных механизмов реализации глюкокортикоидного эффекта и антиглюкокортикоидного эффекта достигнут значительный прогресс. Установлена принципиальная функциональная структура истинного ГР, включающая домен трансактиваии, ДНК-связывающий домен и лиганд-связывающий домен. Использование точечной мутации, вызывающей замену одной аминокислоты в функциональном домене ГР, позволило сузить функцию домена до нескольких компетентных аминокислот, составляющих функциональный ключ специфичности домена. Доказана функциональная роль БТШ в процессах активации, транслокации и димеризации стероид-рецепторного комплекса. Обнаружена функциональная взаимосвязь активированного ГР с фактором трансактиваии AP-I. Определены гормон-реактивные элементы на ДНК, характеризующиеся повышенным сродством к активированному глюкокортикоидрецепторному комплексу, по сравнению с неспецифическими участками ДНК. Взаимодействие ГРЭ с активированным глюкокортикоидрецепторным комплексом обеспечивает последующий биосинтез специфических белков, ответственных за реализацию глюкокортикоидного эффекта, на уровне внутриклеточного метаболизма. Обнаружен механизм и факторы, определяющие тканевую рецепторную гетерогенность глюкокортикоидного эффекта. Вышеизложенное свидетельствует о многофакторности рецепторной регуляции глюкокортикоидного эффекта, что обуславливает значительные сложности при изыскании рецепторных антиглюкокортикоидных средств. Бесспорной, хотя клинически пока и малоэффективной, является концепция изыскания антиглюкокортикоидов, основанная на конкурентных отношениях исследуемых препаратов с природным или синтетическим глюкокортикоидами на уровне ГР. Более продуктивное направление при изыскании антиглюкокортикоидов вытекает из исследований, посвященных изучению антиглюкокортикоидной активности препаратов 9-норстероидного ряда [33]. При этом антиглюкокортикоидный эффект препаратов достигается стабилизацией гетероолигомерной формы ГР, неспособной транслоцироваться в ядро и димеризоваться. Перспективным представляется поиск модуляторов функции ГР, воздействующих прямо или опосредованно на активные центры домена трансактиваии, ДНК-связывающего домена, С-терминального домена.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Голиков П.П., Кириллова Е.Г., Николаева Н.Ю. // *Вопр. мед. химии*, 1983. — Вып. 1. — С. 131-134.
2. Голиков П.П. Рецепторные механизмы глюкокортикоидного эффекта. — М.: "Медицина", 1988. — 288 С.
3. Голиков П.П. // *Бюлл. эксперим. биол. мед.* — 1989. — № 1. — С. 56-58.
4. Голиков П.П. // *Фармакол. токсикол.* — 1991. — № 4. — С. 41-43.
5. Голиков П.П. // *Биохимия*. — 1994. — Т. 5. — С. 703-711.
6. Розен В.Б., Смирнов А.Н. Рецепторы и стероидные гормоны. Рецепторные белки и проблема специфической чувствительности клетки к стероидам. — М.: "Высшая школа", 1981. — 310 С.
7. Сергеев П.В. Стероидные гормоны. — М.: "Наука", 1984. — 240 С.
8. Akner G., Wikstrom A., Gustafsson J. // *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* — 1995. — Vol. 52, № 1. — P. 1-16.
9. Antaclar T., Eisen H.J. // *Endocrinology*. — 1984. — Vol. 15. — P. 1984-1989.
10. Bailey A., LePage C., Milgrom E. // *EMBO J.* — 1986. — Vol. 5. — P. 3235-3241.
11. Baulieu E. // *J. Cell Biochem.* — 1987. — Vol. 35. — P. 161-174.
12. Baxter J.D., Forsham P.H. // *Amer. J. Med.* — 1972. — Vol. 53. — P. 573-589.
13. Bertagna X., Escourolle H. // *J. Clin. Endocr.* — 1984. — Vol. 78. — P. 375-380.
14. Bodwell J.E., Orti E. // *J. Biol. Chem.* — 1991. — Vol. 266. — P. 7549-7555.
15. Buller R., Schwarz R., Schrader W., O'Malley B. // *J. Biol. Chem.* — 1971. — Vol. 251. — P. 5178-5186.
16. Carstedt-Duke J., Gustafsson J. // *J. Biol. Chem.* — 1988. — Vol. 263. — P. 6842-6849.
17. Castellino F. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. — 1992. — Vol. 89. — P. 3775-3779.
18. Chasserot-Golaz S., Beck G. // *J. Steroid Biochem.* — 1984. — Vol. 21. — P. 585-591.
19. Clark A.F., Wilson K. // *Invest. Ophthalmol.* — 1994. — Vol. 35. — P. 281-294.
20. Dahlman-Wright K., Siltara-Reos H., Carlstedt-Duke J. // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265. — P. 14030-14036.
21. Dausse J., Dural D., Meyer P. // *Molec. Pharmacol.* — 1977. — Vol. 13. — P. 948-955.
22. Eriksson P., Dancholt B., Wrange O. // *J. Struct. Biol.* — 1991. — Vol. 107. — P. 48-55.
23. Evans R.M. // *Science*. — 1988. — Vol. 240. — P. 889-895.

24. Evans R.M., Hollenberg S.M. // *Cell*. — 1988. — Vol. 52. — P. 1-3.
25. Feldherr C.M. // *J. Cell. Biol.* — 1984. — Vol. 99. — P. 2216-2222.
26. Gase J.M., Renoir J.M., Baulieu E. // *J. Cell. Biol.* — 1984. — Vol. 98. — P. 1173-1201.
27. Giguere V., Hollenberg S.M. // *Cell* — 1988. — Vol. 46. — P. 645-651.
28. Godowski P.J., Rusconi S., Yamamoto K.R. // *Nature*. — 1987. — Vol. 325. — P. 365-369.
29. Green S., Kumer V., Theuler I. // *EMBO J.* — 1988. — Vol. 7. — P. 3037-3042.
30. Grody W., Schrader W.T. // *Endocr. Rev.* — 1982. — Vol. 3. — P. 141-153.
31. Groyer A., La Boue Y., Radanyi C. // *Eur. J. Biochem.* — 1985. — Vol. 149. — P. 445-451.
32. Hard T., Kellenbach E. // *Science*. — 1990. — Vol. 249. — P. 157-159.
33. Heck S., Kullmann M., Cato A. // *EMBO J.* — 1994. — Vol. 13. — P. 4087-4095.
34. Hoeck W., Groner B. // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265. — P. 5403-5408.
35. Hollenberg S.M., Weinberger C. // *Nature*. — 1985. — Vol. 318. — P. 635-637.
36. Howard K.J., Holley S.J., Yamamoto K.R. // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265. — P. 11928-11933.
37. Johnson L., Baxter J. // *J. Biol. Chem.* — 1978. — Vol. 253. — P. 1991-1997.
38. Kallos J. // *Nature*. — 1977. — Vol. 265. — P. 705-708.
39. Kato J., Takano A. // *J. Steroid Biochem.* — 1987. — Vol. 27. — P. 641-648.
40. La Casse E.C., Lefebvre Y.A. // *J. Steroid Biochem.* — 1991. — Vol. 40. — P. 279-285.
41. Lowy M.T. // *Neuroendocrinology*. — 1990. — Vol. 51. — P. 190-196.
42. Miller W., Leisti S. // *Endocrinology*. — 1984. — Vol. 115. — P. 249-254.
43. Miller J., McLachlan A.D., Klag A. // *EMBO J.* — 1985. — Vol. 4. — P. 1609-1614.
44. Mitra S., Zubay G., Landry A. // *Biochem. biophys. Rev. Commun.* — 1975. — Vol. 67. — P. 857-863.
45. Miyata Y., Yahara I. // *J. Biol. Chem.* — 1991. — Vol. 266. — P. 8779-8783.
46. Moguilewsky M., Philibert D. // *J. Steroid Biochem.* — 1984. — Vol. 20. — P. 271-276.
47. Moudgil V.K. // *Biochem. Biophys. Acta*. — 1990. — Vol. 1055. — P. 243-249.
48. Muller-Diener A., Schmidt T., Litwack G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1985. — Vol. 82. — P. 4003-4007.
49. Nemato T., Mason G. // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265. — P. 2269-2276.
50. Okret S., Carlstedt-Duke J. // *Biochem. Biophys. Acta*. — 1981. — Vol. 677. — P. 205-219.
51. Perrot-Applanat M., Longeat F., Milgrom M. // *Endocrinology*. — 1985. — Vol. 116. — P. 1473-1484.
52. Picard D., Yamamoto K.R. // *EMBO J.* — 1987. — Vol. 6. — P. 3333-3340.
53. Pratt W.B., Jolly D.J., Pratt D.V. // *J. Biol. Chem.* — 1988. — Vol. 263. — P. 267-275.
54. Prachine M. // *Nature*. — 1980. — Vol. 335. — P. 683-685.
55. Radanye C., Joab I., Renoir J.M., Baulieu E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1983. — Vol. 80. — P. 2854-2858.
56. Rexin M., Busch W. // *J. Biol. Chem.* — 1992. — Vol. 267. — P. 9619-9622.
57. Rousseau G. // *Mol. Cell Endocrinol.* — 1984. — Vol. 38. — P. 1-11.
58. Sablonniere B., Danze P.M. // *J. Steroid Biochem.* — 1986. — Vol. 25. — P. 605-614.
59. Sanches E.R. // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265. — P. 22067-22074.
60. Schwarz R., Kuhn R., Buller R. // *J. Biol. Chem.* — 1976. — Vol. 251. — P. 5166-5177.
61. Schweizer G., Cadepond-Vincent F., Baulieu E. // *Biochemistry*. — 1985. — Vol. 24. — P. 1742-1749.
62. Severene V., Wieland S., Shaffner W. // *EMBO J.* — 1988. — Vol. 7. — P. 2503-2508.
63. Surks M., Kumera-Siri M. // *Endocrinology*. — 1984. — Vol. 114. — P. 873-879.
64. Svec P., Teubner V., Tate D. // *Endocrinology*. — 1989. — Vol. 125. — P. 3103-3108.
65. Tasset D., Tora L., Fromental C. // *Cell*. — 1990. — Vol. 62. — P. 1177-1183.
66. Towle H., Tsai M., Tsai S., O'Malley B. // *J. Biol. Chem.* — 1977. — Vol. 252. — P. 2396-2404.
67. Tsai S., Srinivasan G., O'Malley B. // *J. Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265. — P. 17055-17062.
68. Vallette G., Vanet A., Nunez E. // *Endocrinology*. — 1991. — Vol. 129. — P. 1363-1369.
69. Weinberger C., Thompson C.C., Evans R.M. // *Nature*. — 1986. — Vol. 324. — P. 641-645.
70. Welch W.L., Feramisco J.R. // *J. Biol. Chem.* — 1982. — Vol. 257. — P. 14949-14957.
71. Wikstrom A., Bakke O., Okret S. // *Endocrinology*. — 1987. — Vol. 120. — P. 1232-1237.
72. Willmann T., Beato M. // *Nature*. — 1986. — Vol. 324. — P. 688-691.
73. Wrange O., Gustafsson J. // *J. Biol. Chem.* — 1978. — Vol. 253. — P. 856-865.
74. Wrange O., Okret S. // *J. Biol. Chem.* — 1984. — Vol. 259. — P. 4534-4541.
75. Wrange O., Eriksson P. // *J. Biol. Chem.* — 1989. — Vol. 264. — P. 5253-5259.
76. Zubay G. // *Ann. Rev. Genet.* — 1974. — Vol. 7. — P. 267-287.

## RECEPTOR MECHANISMS OF GLUCOCORTICOID AND ANTIGLUCOCORTICOID EFFECT

P.P. Golikov

The Sklifosovsky Research Institute, Moscow, 129010, Sukharevskaya, 3

An analysis of receptor mechanisms of glucocorticoid and antiglucocorticoid effect was made. The limiting link in glucocorticoid and antiglucocorticoid realization are specific cytoplasmic glucocorticoid receptors (GR) which function is controlled by heat shock protein (HSP) of 90 kD molecular weight. Under the influence of glucocorticoids (G), GR are released from GR-HSP complex, forming GR-G complexes. The latter are translocated into cell nucleus, activate the function of genetic apparatus, change biosynthesis of specific enzymes realizing intracellular glucocorticoid effect. Receptor mechanism of antiglucocorticoid effect is realized via competition of steroid and non-steroid drugs with glucocorticoids for binding sites on GR or pharmacological stabilization of GR-HSP complex, decreasing 4SGR release, 4S GR-G forming, and 4SGR-G translocation into cell nucleus. New data about GR chemical structure, according to which GR contain 3 functional domains, characterized by regulatory DNA-binding and ligand-binding activity promote researches of antiglucocorticoids. It promoted synthesis of a new most active receptor antiglucocorticoid RU-486 (19-norsteroid), that inhibits ovalbumin and conalbumin synthesis induced by glucocorticoids.