

ՀՀ ԳԱԱ Ֆ. Խ. ԲՈՒՆԻԱԹՅԱՆԻ ԱՆՎԱՆ ԿԵՆՍԱԶԻՄԻԱՅԻ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ
A 03.00.03
A-406

ՀԱԿՈՐՅԱՆ ՆՈՒՆԵ ՈՈՍԵՆԻ

ԷՍՏՐԱԴԻՈԼԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳԼԽՈՒԴԵՂԻ ԲԶԻՋՆԵՐԻ ՈՐՈՇ
ԵՆԹԱԲԶՋԱՅԻՆ ԿԱՌՈՒՑՎԱԾՔՆԵՐԻ ՖՈՍՖՈՒՆՈԶԻՏԻՆԻ
ԲԱՂԱԴՐՈՒԹՅԱՆ ՎՐԱ

Գ.00.03 – գենետիկա, մոլեկուլային կենսաբանություն
մասնագիտությամբ կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՍԱԳԻՐ

Երևան – 1998

ИНСТИТУТ БИОХИМИИ ИМ. Г.Х.БУНИАТЯНА НАН РА

АКОПЯН НУНЕ РОМОНОВНА

ДЕЙСТВИЕ ЭСТРАДИОЛА НА СОСТАВ ФОСФОИНОЗИТИДОВ
НЕКОТОРЫХ СУБКЛЕТОЧНЫХ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗГА

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук по специальности Г.00.03 - генетика,
молекулярная биология

Ереван - 1998

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի պետական համալսարանում
 Գիտական ղեկավար՝ կենսաբանական գիտությունների դոկտոր,
 պրոֆեսոր ԷՄԻԼ ՍՈՍԻ ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ
 Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կենսաբանական գիտությունների դոկտոր,
 պրոֆեսոր ՊԵՏՐՈՍ ԱՐԱՄԻ ՂԱԶԱՐԹԱՆ
 կենսաբանական գիտությունների դոկտոր,
 պրոֆեսոր ՍԵՐԳԵՅ ԱՇՈՏԻ ԲԱԶԻՆԹԱՆ

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ մոլեկուլային կենսաբանության
 ինստիտուտ
 Պաշտպանությունը կայանալու է. "22" հուլիսի 1998թ. 11⁰⁰ ժ

ՀՀ ԳԱԱ կենսաքիմիայի ինստիտուտի (375014 Երևան, Պ.Սևակի փ. 5/1) 042
 մասնագիտական խորհրդում
 Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ կենսաքիմիայի ինստիտուտի
 գրադարանում
 Սեղմնագիրն առաքված է "22" հունիսի 1998թ.
 Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար,
 կենսաբանական գիտությունների դոկտոր,
 պրոֆեսոր
 Ա.Ա.ՍԻՄՈՆՅԱՆ

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном университете
 Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
 ГЕВОРКЯН ЭМИЛЬ СОСЕВИЧ
 Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
 КАЗАРЯН ПЕТРОС АРАМОВИЧ
 доктор биологических наук, профессор
 БАДЖИНЯН СЕРГЕЙ АШОТОВИЧ

Ведущая организация – Институт молекулярной биологии НАН РА

Защита состоится "22" июля 1998 года, в 11⁰⁰ часов на заседании
 специализированного совета 042 НИИ биохимии НАН РА (375014, Ереван, ул.
 П.Севака 5/1).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке НИИ биохимии НАН РА.
 Автореферат разослан "22" июня 1998 года.
 Ученый секретарь специализированного совета,
 доктор биологических наук, профессор
 А.А.СИМОНЯН

А.А.Симонян
 200-98

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Изучение молекулярных механизмов
 внутриклеточной регуляции является одной из важнейших проблем современной
 молекулярной биологии. Внутриклеточная регуляция, осуществляемая с помощью
 эндогенных регуляторов – гормонов, сопровождается либо модификационными
 изменениями белков, ферментов, либо изменениями уровня их синтеза de novo. В
 совокупности такие изменения приводят к регуляции внутриклеточных обменных
 процессов в клетках-мишенях, сохранению в них нормального физиологического
 статуса.

В настоящее время принято считать, что гормоны, в зависимости от
 молекулярного механизма их воздействия на клетки-мишени, делятся на две
 группы. Первая группа гормонов (пептидные гормоны, катехоламины) передает
 клетке свою информацию путем, так называемого, мембрано-контактного типа
 циторцепции, связываясь с рецепторными белками, расположенными на
 клеточной поверхности. Такое высокоспецифическое связывание приводит к
 стимуляции трансмембранных универсальных механизмов, в результате чего
 гормональная информация передается во внутриклеточный метаболизм,
 посредством вторичных посредников (Розен, 1980; Cooper, Spraulding, 1985; Calvo
 et al 1996 и др). Функционирование в настоящее время хорошо известных этих
 механизмов (циклонуклеотидный и фосфоинозитидный) приводит к регуляции
 внутриклеточного метаболизма, главным образом, посредством модификации
 структуры белков, ферментов. Наряду с этим, гормоны второй группы (стероидные
 и тиреоидные гормоны), действуя на клетки-мишени посредством
 внутриклеточного типа циторцепции, регулируют метаболизм клетки, в основном,
 изменяя в них уровень биосинтетических процессов белков. Причем эти гормоны,
 будучи липофильными, сравнительно легко проникают в клетку, высокоаффинно
 связываются там с соответствующими рецепторными белками, образуя гормон-
 рецепторные комплексы. Специфическое взаимодействие этих комплексов с
 генетическим аппаратом клетки, в процессе которого рецепторы выступают как
 факторы транскрипции, приводит к усилению синтеза белков de novo (Розен, 1980;
 Brann et al, 1995; Yamamoto, 1995, 1996; Guiochon-Mantel et al, 1996; Beato et al,
 1996; Jeyakumar et al 1997).

За последние два десятилетия в научной литературе появились данные,
 свидетельствующие о возможной взаимосвязи этих двух механизмов гормональной
 циторцепции. В частности, в ряде исследований показано, что стероидные
 гормоны способны также воздействовать на циклонуклеотидный и
 фосфоинозитидный пути регуляции (Бужурина, Панов, 1986; Brann et al 1995;
 Sadler et al, 1996), в то же время пептидные гормоны, в частности инсулин,
 способны интернализироваться в клетку и взаимодействовать с геномом (Dumontel,
 1996). В ряде работ показано, что рецепторы стероидных гормонов имеются также
 на поверхности мембран (Brann et al, 1996; Sadler et al, 1996), то есть при
 взаимодействии гормонов с клетками-мишенями не исключается их воздействие на
 циклонуклеотидный или фосфоинозитидный механизмы. Ауриккио и сотр.
 (Migliaccio et al, 1984, 1986; Auricchio et al, 1985, 1987, 1996) выяснили, что
 активация внутриклеточных рецепторов эстрадиола, необходимая для их
 взаимодействия с гормоном, представляет собой процесс фосфорилирования
 рецептора, который осуществляется протеинкиназами, регулируемые
 фосфоинозитидным механизмом. Вместе с тем, было показано, что на первичных
 этапах воздействия эстрадиола способен инициировать функционирование
 фосфоинозитидного регуляторного механизма, а действуя на уровне генома клеток,
 на раннем этапе воздействия и активируя биосинтетические процессы белков,
 привести к изменению физиологического статуса мембран, что может сказываться
 также на функционировании фосфоинозитидного механизма (Grove, Korach, 1987;
 Геворкян, Тадевосян 1990; Тадевосян, Геворкян, 1990; Brann et al 1995; Schulman et
 al, 1996).

Таким образом, несмотря на имеющиеся в литературе данные, в
 настоящее время изучение взаимозависимости механизмов мембрано-контактной

и внутриклеточной циторецепций гормонов далеко не удовлетворительно. Исследования в этом направлении имеют большое значение как в аспекте дальнейшего изучения молекулярных механизмов действия гормонов, так и в отношении выяснения интимных гормональных механизмов внутриклеточной регуляции. Настоящая работа является частью исследований, посвященных этой проблеме.

Цель и задачи исследования. Основной целью диссертационной работы было изучение количественных изменений отдельных фракций фосфоинозитидов — как ключевых в функционировании фосфоинозитидного регуляторного механизма липидов, в некоторых мембранных и немембранных субклеточных структурах головного мозга крыс на первичном, раннем и позднем этапах *in vivo* воздействия эстрадиола.

В задачи работы входило:

1. Исследовать содержание общих фосфолипидов, а также их отдельных фракций, в особенности, фосфоинозитидов в синапсосомах клеток головного мозга крыс на разных этапах воздействия эстрадиола.

2. Изучить сдвиги в содержании фосфолипидов, в особенности, фосфоинозитидов в препаратах ядерных мембран клеток головного мозга крыс на разных этапах воздействия эстрадиола.

3. Изучить сдвиги в составе фосфолипидов и, в особенности, фосфоинозитидов ядерного матрикса клеток головного мозга крыс при активирующем геном воздействии эстрадиола.

4. Изучить сдвиги в содержании отдельных фракций фосфолипидов и, в особенности, фосфоинозитидов хроматина клеток головного мозга крыс при активирующем геном воздействии эстрадиола.

Научная новизна работы. В результате проведенных исследований выяснено, что в синапсосомах и ядерных структурах (ядерная мембрана, ядерный матрикс, хроматин) головного мозга крыс воздействие эстрадиола сопровождается сдвигами содержания общих фосфолипидов и их отдельных фракций, что более выражено на раннем этапе воздействия гормона. При этом показано повышение общего содержания фосфолипидов и, в частности, фосфоинозитидов как на первичном, так и на раннем этапах воздействия эстрадиола. Выявлена разнонаправленность изменений фосфатидилохолина и сфингомиелина внутриядерных структур клеток головного мозга крыс при *in vivo* воздействии эстрадиола. Одновременно, установлено, что при воздействии эстрадиола как в мембранных (синапсосомы и ядерные мембраны), так и внутриядерных (ядерный матрикс и хроматин) структурах происходит заметное перераспределение содержания фосфоинозитидов, причем повышение содержания монофосфоинозитида сопровождается уменьшением количества трифосфоинозитида, т.е. наблюдается достоверное снижение соотношения трифосфоинозитид/монофосфоинозитид, что не может не иметь важное значение в функционировании фосфоинозитидного регуляторного механизма в мембранных субклеточных структурах.

Практическое значение работы. Изучение молекулярных механизмов действия эстрадиола на состав фосфолипидов и фосфоинозитидов в некоторых субклеточных структурах головного мозга, несомненно, может иметь также практическое значение, в особенности, для выяснения некоторых задач клинической эндокринологии, в частности, гормонотерапии. Выявление возможных путей гормональной регуляции липидного обмена может оказаться весьма перспективным для лечения обменных метаболических заболеваний.

Апробация диссертационной работы. Результаты работы докладывались на: конференции "Биология старения", посвященной 50-летию основания ХГУ, Харьков, Украина, 1995; IX Международной конференции по вторичным посредникам и фосфопротеинам, Нешвилл, США, 1995; научной конференции, посвященной 30-летию основания отделения биологии биологического факультета ЕГУ, Ереван, 1996; конференции, посвященной 30-летию основания института молекулярной биологии НАН РА, Ереван, 1997.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ (3 статьи и 5 тезисов).

Объем и структура работы. Работа изложена на 125 страницах и содержит 14 таблиц и 12 рисунков. Библиография включает 258 наименований литературных источников, из них 25 на русском и 233 на иностранных языках.

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

В главе I ("Обзор литературы") изложены современные представления о механизмах действия стероидных гормонов и о фосфоинозитидном пути внутриклеточной регуляции.

Краткое содержание остальных глав приводится ниже.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили на белых беспородных половозрелых крысах-самках массой 100-150 г. Эстрадиол — 17 В (фирма "Sigma", США) вводили в брюшную полость в концентрации 20 мкг на 100 г массы животного. Крыс декапитировали через 0,5; 1; 4 и 24 часа после введения гормона.

Выделение синапсосом. Синапсосомы из клеток головного мозга крыс выделяли центрифугированием в градиенте сахарозы по методу Айюша (Hayos, 1975).

Выделение ядер. Ядра из клеток головного мозга крыс выделяли по методу Чу и др. (Choi et al., 1977).

Выделение ядерных мембран. Ядерные мембраны клеток головного мозга крыс выделяли из очищенных ядер по методу Березни и др. (Berezney et al., 1970).

Выделение ядерного матрикса. Ядерный матрикс клеток головного мозга крыс выделяли по методу Березни и Кофи (Berezney, Coffey, 1976).

Выделение хроматина. Хроматин из очищенных ядер клеток головного мозга крыс выделяли по методу Шо и Хуанга (Shaw, Huang, 1970).

Определение белка, ДНК и РНК. Количество белка в пробах определяли по методу Лоури и др. (Lowry et al., 1951). Экстракцию и гидролиз нуклеиновых кислот проводили по методу Спелсберга и Хнилицы (Spelsberg, Hnilica, 1971). Количественное определение ДНК и РНК проводили спектрофотометрически, по методу Шмида и Танхаузера (Schmidt, Tannhauser, 1945).

Экстракция фосфолипидов. Фосфолипиды в пробах экстрагировали по методу Каргаполова (Каргаполов, 1981).

Кислотная экстракция фосфоинозитидов. Фосфоинозитиды выделяли из остатка после экстракции фосфолипидов путем избирательной кислотной экстракции (Бергельсон и др., 1981).

Определение содержания фосфора в фосфолипидах. Количество фосфолипидов определяли по содержанию неорганического фосфора, по методу Эймса (Ames, 1966), после минерализации проб фосфолипидных экстрактов в присутствии 5N H₂SO₄ и концентрированной HNO₃.

Фракционирование фосфолипидов и фосфоинозитидов. Фракционирование фосфолипидов проводили методом тонкослойной хроматографии, на пластинках (9 x 24 см², толщина слоя 250 мкм) с силикагелем L в системе растворителей хлороформ — метанол — вода в соотношении 65:25:4 (Кирхнер, 1981).

Фосфоинозитиды фракционировали методом микротонкослойной хроматографии, на пластинках с силикагелем КСК, импрегнированных оксалатом калия (пластинки 6 x 9 см², толщина слоя 5-7 мкм). Для разделения использовали систему растворителей хлороформ — метанол — 4N NH₄OH в соотношении 9:7:2 (Бергельсон, 1981).

Пятна фосфолипидов после фракционирования проявляли парами йода. Для идентификации отдельных фракций использовали стандартные фосфолипиды.

Количественное определение фосфолипидов, в том числе фосфоинозитидов проводили по неорганическому фосфору (Ames, 1966).

Результаты экспериментов обрабатывали статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Действие эстрадиола на состав фосфоинозитидов синапсом клеток головного мозга крыс

Общеизвестно, что стероидные гормоны имеют внутриклеточный тип циторецепции, однако некоторые литературные данные (Grove, Kogach, 1987; Ruzusky, Crankshaw, 1988) свидетельствуют о том, что стероиды способны воздействовать на инициацию и функционирование фосфоинозитидного механизма. А функционирование фосфоинозитидного механизма наряду с другими факторами во многом зависит от содержания и соотношения фосфоинозитидов, которые могут изменяться в зависимости от функционального статуса мембран. С этой точки зрения, изучение состава полифосфоинозитидов при воздействии стероидного гормона эстрадиола, способного опосредованно (посредством регуляции биосинтетических процессов) повлиять на функциональный статус мембран, представляло определенный интерес.

Первая серия экспериментов была посвящена изучению содержания фосфолипидов, а также моно-, ди- и трифосфоинозитидов в синапсомах головного мозга крыс на разных этапах *in vivo* воздействия эстрадиола.

Применение одномерной тонкослойной хроматографии позволило выявить наличие семи индивидуальных фракций фосфолипидов синапсомом (табл. 1). Главными фосфолипидами синапсомом являются фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин, составляющие соответственно около 30 и 20% от общего количества фосфолипидов. Остальные пять фракций представлены примерно в равных количествах (табл. 1).

В таблице 1 приведены также результаты по изучению содержания фосфолипидов синапсомом через 1; 4 и 24 ч. после введения эстрадиола. Выбор этих экспозиций был обусловлен литературными данными о том, что уже через час после введения гормона, на первичном этапе его воздействия, усиливается синтез липидов, в то время как на раннем этапе воздействия стероида (4-часовая экспозиция) активируются биосинтетические процессы функциональных белков. Известно также, что стероидная индукция этих белков нивелируется на позднем этапе воздействия (24-часовая экспозиция).

Приведенные в табл. 1 результаты показывают, что как 1-часовое так и 24-часовое воздействие эстрадиола не приводят к достоверному изменению содержания общих фосфолипидов. Достоверное повышение содержания общих фосфолипидов (до 45%) наблюдается лишь через 4 часа после воздействия эстрадиола.

Следует отметить, что повышение содержания общих фосфолипидов неоднозначно сказывается на количестве их отдельных фракций. Причем, изменения в содержании отдельных фракций фосфолипидов наблюдаются как на раннем (через 4 часа после введения), так и на первичном (через 1 час после введения) этапах воздействия эстрадиола. Более значительным изменениям подвергаются фосфолипиды на 4-ом часу воздействия гормона. Полученные нами данные свидетельствуют о достоверных изменениях пяти фракций фосфолипидов, причем наибольшему повышению (трехкратному) подвергается фракция

Таблица 1
Содержание общих фосфолипидов и их отдельных фракций в синапсомах клеток головного мозга крыс в контроле и при воздействии эстрадиола

| Фосфолипиды | Экспозиция гормона в часах | | | | | | | |
|----------------------|----------------------------|------|------------------|------|-------------------|------|------------------|------|
| | Контроль | | 1 | | 4 | | 24 | |
| | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % |
| Фосфатидилсерин | 47,30 ±4,89 | 9,0 | 44,40 ±1,85 | 8,5 | *65,12 ±5,62 | 8,6 | 51,50 ±1,82 | 8,9 |
| Сфингомиелин | 46,25 ±2,63 | 8,8 | 49,06 ±2,54 | 9,5 | *144,12 ±13,20 | 19,2 | 43,87 ±3,01 | 7,7 |
| Фосфатидилинозитол | 47,71 ±3,43 | 9,1 | *101,96 ±3,05 | 19,6 | *64,36 ±5,68 | 8,6 | 57,94 ±1,70 | 10,1 |
| Фосфатидилхолин | 145,90 ±3,18 | 27,8 | 125,20 ±3,00 | 24,5 | *214,12 ±5,38 | 28,5 | *190,60 ±2,26 | 33,2 |
| Фосфатидилэтаноламин | 111,57 ±3,62 | 21,3 | 86,41 ±1,89 | 16,7 | 117,74 ±15,61 | 15,7 | 124,90±1 96 | 21,7 |
| Кардиолипид | 66,66 ±3,51 | 12,6 | 54,83 ±2,89 | 10,6 | 62,21 ±6,31 | 8,2 | 54,72 ±4,38 | 9,5 |
| Фосфатидная кислота | 59,72 ±3,48 | 11,4 | 56,67 ±1,84 | 10,9 | *84,88 ±10,31 | 11,2 | 51,19 ±3,25 | 8,9 |
| Общие фосфолипиды | 525,11 ±24,74 | 100 | 518,53 ±17,06 | 100 | *752,55 ±62,11 | 100 | 580,12±1 8,38 | 100 |

* - P<0,05

сфингомиелина. Содержание фосфатидилхолина повышается в среднем на 47%, фосфатидной кислоты на 42%, фосфатидилсерина на 38% и фосфатидилинозитола на 35% (табл. 1).

Итак, полученные результаты свидетельствуют о сдвигах в содержании как общего фосфолипида, так и отдельных его фракций в синапсомах, особенно после 4-х часового воздействия эстрадиола, что, по-видимому, связано с эстрадиоловой активацией биосинтетических процессов в клетках головного мозга крыс.

Ранее Геворкян и Тадевосян было показано, что эстрадиол при воздействии *in vivo*, в концентрациях и при экспозиции, приводящих к активации биосинтетических процессов, способен повлиять на инициацию фосфоинозитидного механизма (Геворкян, Тадевосян, 1990). Вместе с тем, известно, что инициация механизма осуществляется распадом не фосфатидилинозитола, а фосфатидилинозитола 4,5 - дифосфата, т.е. трифосфоинозитида. Следовательно, влияние гормона на иницируемость фосфоинозитидного механизма может затрагивать также его воздействие на состав полифосфоинозитидов в мембранах синапсомом. Для проверки данного предположения были проведены эксперименты по изучению состава и содержания полифосфоинозитидов в мембранах синапсомом, результаты которых представлены в таблице 2. Как видно из таблицы, значительное

повышение общего количества фосфоинозитидов наблюдается через 1 ч после введения гормона (почти двукратное повышение содержания монофосфоинозитида, повышение количества дифосфоинозитида на 50%, снижение количества трифосфоинозитида на 20%). При 4-часовой экспозиции действия гормона наблюдается повышение содержания монофосфоинозитида и дифосфоинозитида, в то время как 24-часовое воздействие не приводит к достоверным изменениям содержания всех трех фракций (табл. 2).

Таблица 2
Содержание фосфоинозитидов в синапсоммах клеток головного мозга крыс в контроле и при воздействии эстрадиола

| Фосфоинозитиды | Экспозиция гормона в часах | | | | | | | |
|-------------------|----------------------------|-----|----------------|------|---------------|-----|--------------|-----|
| | Контроль | | 1 | | 4 | | 24 | |
| | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % |
| Монофосфоинозитид | 44,60 ± 1,26 | 54 | *95,20 ± 1,82 | 68,0 | *58,80 ± 1,09 | 59 | 50,20 ± 1,82 | 50 |
| Дифосфоинозитид | 21,20 ± 0,50 | 26 | *32,60 ± 1,29 | 22,5 | 23,80 ± 0,47 | 24 | 25,60 ± 0,99 | 25 |
| Трифосфоинозитид | 16,60 ± 0,46 | 20 | *13,40 ± 1,08 | 9,5 | 16,60 ± 0,34 | 17 | 14,60 ± 0,27 | 17 |
| Общее содержание | 82,40 ± 2,22 | 100 | *141,20 ± 4,19 | 100 | *99,20 ± 1,90 | 100 | 90,40 ± 3,08 | 100 |

* - P < 0,05

Полученные результаты свидетельствуют о том, что воздействие эстрадиола как на первичном, так и на раннем этапах приводит, главным образом, к повышению количества монофосфоинозитида, причем это повышение заметнее проявляется на первичном этапе воздействия гормона и имеет место не за счет снижения содержания ди- и трифосфоинозитидов, что, вероятно свидетельствует об активации синтетических процессов фосфолипидов стероидным гормоном. Наряду с этим необходимо отметить также достоверное снижение содержания трифосфоинозитидов после 1-часового воздействия гормона, что свидетельствует о заметном перераспределении полифосфоинозитидов в мембранах синапсом. Примечательно, что соотношение трифосфоинозитид / монофосфоинозитид снижается более чем в 2,5 раза на первичном этапе воздействия гормона, что не может не сказываться на иницируемости и функционировании фосфоинозитидного регуляторного механизма. Полученные результаты показывают, что это соотношение в контрольных вариантах опытов составляет 0,35-0,37, в то время как при воздействии эстрадиола оно уменьшается до 0,14-0,16 на первичном этапе и до 0,27-0,28 на раннем этапе.

2. Действие эстрадиола на состав фосфоинозитидов ядерных мембран клеток головного мозга крыс

Данная часть экспериментов была посвящена изучению содержания фосфолипидов, а также моно-, ди- и трифосфоинозитидов в препаратах ядерных мембран головного мозга крыс на разных этапах воздействия эстрадиола *in vivo*. Изучение фосфолипидного состава ядерных мембран выявило наличие семи индивидуальных фракций, причем содержание фосфатидилохолина и фосфатидилэтаноламина составляло около 50% от общего содержания фосфолипидов, а остальные пять фракций были представлены примерно в равных количествах (табл. 3).

Таблица 3
Содержание общих фосфолипидов и их отдельных фракций в ядерных мембранах клеток головного мозга крыс в контроле и при воздействии эстрадиола

| Фосфолипиды | Экспозиция гормона в часах | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------------------------|------|----------------|------|------------------|------|------------------|------|---------------|------|--|--|--|--|--|--|
| | Контроль | | 0,5 | | 1 | | 4 | | 24 | | | | | | | |
| | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | | | | | | |
| Фосфатидилсерин | 81,60 ± 1,37 | 9,4 | *88,60 ± 0,94 | 9,7 | *97,30 ± 1,86 | 8,8 | *89,70 ± 1,54 | 8,4 | 84,20 ± 0,79 | 9,6 | | | | | | |
| Сфингомиелин | 89,00 ± 1,34 | 10,2 | 86,00 ± 2,16 | 9,4 | *110,00 ± 2,28 | 10,0 | 122,30 ± 0,82 | 11,5 | 89,80 ± 0,95 | 10,2 | | | | | | |
| Фосфатидил-инозитол | 107,00 ± 1,19 | 12,3 | *142,00 ± 2,26 | 15,6 | *145,00 ± 2,57 | 13,2 | *132,50 ± 1,40 | 12,4 | 107,20 ± 1,27 | 12,2 | | | | | | |
| Фосфатидилохолин | 260,00 ± 4,24 | 30,0 | 245,00 ± 3,66 | 26,8 | *309,00 ± 5,16 | 28,1 | *308,30 ± 2,66 | 28,9 | 255,20 ± 1,42 | 29,1 | | | | | | |
| Фосфатидил-этаноламин | 174,00 ± 2,39 | 20,0 | 175,00 ± 2,85 | 19,1 | *231,00 ± 2,99 | 21,0 | *238,40 ± 4,99 | 22,3 | 171,80 ± 0,66 | 19,5 | | | | | | |
| Фосфатидная кислота | 83,00 ± 1,25 | 9,5 | 90,00 ± 0,97 | 9,8 | *104,00 ± 1,69 | 9,5 | 88,00 ± 1,20 | 8,3 | 87,20 ± 0,85 | 9,9 | | | | | | |
| Кардиолипин | 75,00 ± 1,30 | 8,6 | *88,00 ± 1,25 | 9,6 | *103,50 ± 1,79 | 9,4 | *87,80 ± 1,14 | 8,2 | *83,80 ± 0,95 | 9,5 | | | | | | |
| Общие фосфолипиды | 869,60 ± 13,08 | 100 | 914,60 ± 14,09 | 100 | *1099,80 ± 18,34 | 100 | *1067,00 ± 13,75 | 100 | 879,20 ± 6,89 | 100 | | | | | | |

* - P < 0,05

В таблице 3 приведены также результаты изучения фосфолипидного состава ядерных мембран после введения животным эстрадиола. Через 1 и 4 часа после воздействия гормона содержание общих фосфолипидов в ядерных мембранах повышалось на 22-26%, в то время как полчасовая и 24-часовая экспозиция гормона не приводили к достоверным изменениям в содержании фосфолипидов. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что эстрадиол при воздействии *in vivo* способен вызвать заметные перестройки в составе фосфолипидов ядерных мембран клеток головного мозга крысы, видимо необходимые для реализации действия гормона на геном. На последнее указывает также отсутствие гормонального эффекта на первичном (0,5 часа) и позднем (24 часа) этапах воздействия эстрадиола (табл.3). Под действием гормона наблюдается повышение содержания почти всех индивидуальных фракций фосфолипидов, что, по нашему мнению, свидетельствует об универсальном и однозначном характере влияния гормона на обмен фосфолипидов в ядрах (табл.3). Эти сдвиги могут изменить функциональный статус ядерных мембран, в результате чего, заметное повышение содержания фосфатидилинозитола в мембранах может сказываться на функционировании фосфоинозитидной регуляторной системы, наличие которой в ядерных мембранах нельзя исключить, исходя из некоторых данных научной литературы (Asano et al., 1994). Проведенные нами дальнейшие исследования по изучению содержания фосфоинозитидов в ядерных мембранах клеток головного мозга крысы, показали, что повышение содержания монофосфоинозита (28-40%) на первичном и раннем этапах воздействия гормона, газным образом, происходит за счет снижения содержания ди- и, в особенности, трифосфоинозита, что свидетельствует о заметном перераспределении полифосфоинозитидов в ядерных мембранах (табл. 4). По-видимому, эстрадиол регулирует активность ферментов, ответственных за взаимопревращение фосфоинозитидов, и полученное нами 24-36% повышение содержания фосфатидилинозитола (т.е. монофосфоинозита) (табл.3) не является следствием активации синтетических процессов фосфолипидов вызванных стероидом, тем более, что повышение общего содержания трех фракций фосфоинозитидов недостоверно (табл.4).

Таблица 4

Содержание полифосфоинозитидов в ядерных мембранах клеток головного мозга крысы в контроле и при воздействии эстрадиола

| Фосфо-инозитиды | Экспозиция гормона в часах | | | | | | | | | |
|-------------------|----------------------------|------|------------------|------|------------------|------|------------------|------|------------------|------|
| | Контроль | | 0,5 | | 1 | | 4 | | 24 | |
| | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % |
| Монофосфоинозитид | 101,30 ±1,92 | 46,4 | *133,00 ±3,40 | 59,2 | *142,50 ±3,39 | 59,8 | *130,00 ±1,47 | 54,8 | *109,30 ±1,68 | 49,5 |
| Дифосфоинозитид | 68,20 ±0,93 | 28,8 | *55,60 ±0,90 | 24,8 | *62,80 ±0,77 | 26,3 | 67,70 ±0,64 | 28,6 | 63,40 ±1,56 | 28,7 |
| Трифосфоинозитид | 54,00 ±0,53 | 24,8 | *36,20 ±0,79 | 16,0 | *33,00 ±0,71 | 13,9 | *39,30 ±1,04 | 16,6 | 48,10 ±3,75 | 21,8 |
| Общее содержание | 223,50 ±3,38 | 100 | 224,80 ±5,09 | 100 | 238,30 ±4,87 | 100 | 237,00 ±3,15 | 100 | 220,80 ±6,99 | 100 |

* — $P < 0,01$

Результаты исследований показывают, что стероидное воздействие вызывает снижение соотношения трифосфоинозитид/монофосфоинозитид примерно в 1,8-2,3 раза, в зависимости от экспозиции гормона, что не может не сказываться на возможном функционировании фосфоинозитидного механизма в ядерных мембранах.

3. Действие эстрадиола на состав фосфоинозитидов ядерного матрикса клеток головного мозга крысы

Важную структурно-функциональную роль ядерного матрикса в жизнедеятельности клетки трудно переоценить. Хотя фосфолипиды представлены в матриксе в малых количествах, не исключена возможность их участия в таких фундаментальных процессах, как репликация и транскрипция, тем более, что липидные компоненты других ядерных структур несут определенную функциональную нагрузку (Левитана, 1975; Viola-Magni et al., 1985). Не исключено также участие липидов ядерного матрикса в процессах гормональной регуляции генетического аппарата.

Данная серия экспериментов была посвящена изучению содержания фосфолипидов, а также моно-, ди- и трифосфоинозитидов в препаратах ядерного матрикса клеток головного мозга крысы на первичном, раннем и позднем этапах *in vivo* воздействия эстрадиола, что позволит ближе подойти к пониманию роли фосфолипидов ядерных структур в процессах стероидной регуляции генома.

Фракционирование фосфолипидов препаратов ядерного матрикса выявило наличие шести индивидуальных фракций с характерным для этих препаратов процентным соотношением (табл.5); более 30% общих фосфолипидов представлено сфингомиелином, в то время как содержание основного фосфолипида ядер — фосфатидилхолина не доходит до 22%. Обращает на себя внимание также присутствие в препаратах заметного количества фосфатидилэтаноламина (примерно 16%), фосфатидилинозитола (12,7%), в особенности, кардиолипина и фосфатидной кислоты (10,2 и 9,1% соответственно) — фосфолипидов характерных для внутренних структур ядра (Алесенко и др., 1982).

В таблице 5 приведены также результаты по изучению действия эстрадиола на содержание фосфолипидов в ядерном матриксе. Эстрадиол приводит к достоверному повышению содержания общих фосфолипидов (примерно на 15-20%) лишь через 1 и 4 часа после введения гормона, (табл.5), что свидетельствует о влиянии стероида на липидный состав матрикса посредством активации им биосинтетических процессов. Примечательно, что 0,5-часовая и 24-часовая экспозиция гормона не приводят к достоверным изменениям общего содержания фосфолипидов. В то же время, изменения в содержании отдельных фракций фосфолипидов наблюдаются как на раннем (через 4 часа после введения гормона), так и на первичном (через 0,5 и 1 час после введения) этапах воздействия эстрадиола (табл. 5). Последнее указывает на быстрое действие гормона, приводящее к межфракционным превращениям фосфолипидов внутриядерных структур, в частности, ядерного матрикса. Разнонаправленность изменений в содержании фосфатидилхолина и сфингомиелина, по-видимому, объясняется гормональным усилением процесса перехода фосфорилхолина с молекулы фосфатидилхолина на молекулу сфингомиелина (Nelson et al., 1981). Известно, что высокая концентрация сфингомиелина в ядерном матриксе объясняется возможной ролью этого фосфолипида в инициации репликации ДНК, а повышение его относительного содержания может привести к дестабилизации структуры ДНК, разрыхлению суперструктуры хроматина, что будет способствовать повышению его матричной активности при воздействии стероида (Алесенко и др., 1982; Геворкян и др. 1987). С таким предположением созвучны полученные нами результаты, свидетельствующие о том, что достоверное повышение доли сфингомиелина в общем количестве фосфолипидов ядерного матрикса наблюдается лишь на 4-ом часу воздействия гормона, т.е. при максимальной активации биосинтетических процессов (табл. 5).

Результаты, полученные нами показывают, что на первичном этапе воздействия эстрадиола наиболее значительное повышение наблюдается в содержании фосфатидилинозитола (на 25% — при 0,5- часовой и на 52% — при 1-часовой экспозициях гормона, табл. 5). Примечательно, что фосфатидилинозитола

Таблица 5
Содержание общих фосфолипидов и их отдельных фракций в ядерном матриксе клеток головного мозга крыс в контроле и при воздействии эстрадиола

| Фосфолипиды | Экспозиция гормона в часах | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|----------------------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--------------|------|--|--|
| | Контроль | | 0,5 | | 1 | | 4 | | 24 | | | |
| | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | | |
| Сфингомиелин | 12,97±0,04 | 30,6 | 13,06±0,04 | 29,4 | *14,56±0,11 | 29,8 | *17,82±0,18 | 35,4 | 12,46±0,69 | 29,4 | | |
| Фосфатидил-инозитол | 5,41±0,08 | 12,7 | *6,75±0,25 | 15,2 | *8,20±0,03 | 16,8 | *6,37±0,05 | 12,6 | 5,64±0,09 | 13,3 | | |
| Фосфатидил-холин | 9,18±0,04 | 21,7 | *8,43±0,08 | 19,0 | *8,25±0,05 | 16,9 | *7,41±0,10 | 14,7 | 8,87±0,09 | 20,9 | | |
| Фосфатидил-этаноламин | 6,65±0,15 | 15,7 | *7,52±0,05 | 16,9 | *7,98±0,05 | 16,3 | *8,28±0,03 | 16,5 | 7,16±0,07 | 16,9 | | |
| Фосфатидная кислота | 3,85±0,08 | 9,1 | *4,12±0,05 | 9,3 | *4,74±0,03 | 9,7 | *5,02±0,08 | 10,0 | 3,88±0,02 | 9,1 | | |
| Кардиолипин | 4,34±0,16 | 10,2 | *4,55±0,01 | 10,2 | *5,12±0,03 | 10,5 | *5,45±0,03 | 10,8 | 4,42±0,09 | 10,4 | | |
| Общие фосфолипиды | 42,40±0,55 | 100 | 44,43±0,48 | 100 | *48,85±0,30 | 100 | *50,3±0,47 | 100 | 42,43±1,05 | 100 | | |

* - P<0,05

является единственной фракцией, доля которой в общем содержании фосфолипидов ядерного матрикса заметно повышается на первичном этапе воздействия гормона (с 12,7% - в контроле, до 16,8% - после воздействия эстрадиола), а на раннем и позднем этапах воздействия снижается до контрольного уровня. Изменения в содержании фосфолипида, несущего значительную функциональную нагрузку особенно в нервной ткани, могут быть опосредованно связаны с воздействием стероидного гормона на функционирование фосфоинозитидного регуляторного механизма, наличие которого в ядрах можно считать вероятным (Asano et al., 1994). Проведенный нами анализ состава фосфоинозитидов фракций ядерного матрикса показал, что если общее количество фосфоинозитидов достоверно не изменяется при воздействии гормона, то содержание всех трех фракций при этом значительно изменяется (табл. 6). Повышение содержания монофосфоинозитидов сопровождается снижением количества ди- и трифосфоинозитидов как на первичном, так и на раннем этапах воздействия эстрадиола. Примечательно, что соотношение трифосфоинозитид/монофосфоинозитид снижается более чем в 2,5 раза на первичном этапе, а на позднем этапе воздействия доходит до контрольного уровня. Наблюдаемое перераспределение в фосфоинозитидах ядерного матрикса, указывает на то, что эстрадиол, при активации биосинтетических процессов, способен вызывать изменения в содержании фосфоинозитидов внутриядерных структур, по-видимому, однозначно влияя на активность ферментов, ответственных за их взаимопревращения.

Таблица 6
Содержание фосфоинозитидов в ядерном матриксе клеток головного мозга крыс в контроле и при воздействии эстрадиола

| Фосфоинозитиды | Экспозиция гормона в часах | | | | | | | | | |
|-------------------|----------------------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|
| | Контроль | | 0,5 | | 1 | | 4 | | 24 | |
| | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % |
| Монофосфоинозитид | 6,51±0,07 | 46 | *8,14±0,06 | 58 | *9,77±0,05 | 65 | *7,70±0,05 | 60 | 6,74±0,06 | 49 |
| Дифосфоинозитид | 4,24±0,03 | 30 | *3,55±0,02 | 26 | *3,37±0,02 | 22 | *2,53±0,03 | 20 | *4,06±0,05 | 29 |
| Трифосфоинозитид | 3,36±0,03 | 24 | *2,23±0,03 | 16 | *1,87±0,02 | 13 | *2,62±0,03 | 20 | 3,04±0,03 | 22 |
| Общее содержание | 14,11±0,13 | 100 | 13,92±0,11 | 100 | *15,01±0,09 | 100 | *12,85±0,11 | 100 | *13,84±0,14 | 100 |

* - P<0,05

Таким образом, эстрадиол на первичном и раннем этапах воздействия способен как активировать синтетические процессы фосфолипидов, так и вызывать заметное межфракционное перераспределение индивидуальных фосфолипидов ядерного матрикса, которые могут быть связаны с процессами специфической активации генома вызванных воздействием стероида.

4. Действие эстрадиола на состав фосфоинозитидов хроматина клеток головного мозга крыс

Основным этапом в молекулярном механизме действия стероидных гормонов на геном клеток-мишеней является связывание ядерных рецепторов - факторов транскрипции с хроматином, в частности, со специфическими последовательностями ДНК (Ziliacus et al., 1995; McEwen et al., 1997). При этом специфические сдвиги могут наблюдаться как в составе главных, так и вторичных

компонентов хроматина, какими являются липиды. Эти липиды, в особенности фосфолипиды, могут влиять на функциональную активность генома, возможно, образуя с негистоновыми белками хроматина липопротеидные комплексы, регулирующие генную активность.

Данная серия экспериментов была посвящена изучению качественного и количественного состава фосфолипидов и моно-, ди- и трифосфоинозитидов в препаратах хроматина клеток головного мозга крыс на раннем (через 4 часа после введения) этапе воздействия эстрадиола. Фракционирование выявило наличие шести фосфолипидов в препаратах хроматина, причем более 2/3 общего количества фосфолипидов представлено фосфатидилхолином – 23,5%, фосфатидилэтаноламином – 20,4% и сфингомиелином – 21,4%, в то время как кардиолипин, фосфатидилинозитол и фосфатидилсерин составляют лишь 10–15% каждый (табл.7). Результаты наших исследований показали, что воздействие

Таблица 7
Содержание общих фосфолипидов и их отдельных фракций в препаратах хроматина клеток головного мозга крыс в контроле и при воздействии эстрадиола

| Фосфолипиды | Контроль | | Эстрадиол | |
|----------------------|--------------|------|--------------|------|
| | мкг/мг белка | % | мкг/мг белка | % |
| Фосфатидилхолин | 23,80±2,38 | 23,5 | 24,60±2,11 | 19,4 |
| Сфингомиелин | 21,70±1,50 | 21,4 | *33,60±3,31 | 26,5 |
| Фосфатидилэтаноламин | 20,65±2,40 | 20,4 | *25,15±2,37 | 19,8 |
| Кардиолипин | 14,95±1,53 | 14,8 | 17,75±1,66 | 14,0 |
| Фосфатидилинозитол | 10,10±1,02 | 10,0 | *15,05±1,30 | 11,9 |
| Фосфатидилсерин | 10,05±1,56 | 9,9 | 10,65±1,78 | 8,4 |
| Общие фосфолипиды | 101,25±9,3 | 100 | *126,80±11,5 | 100 |

* – P<0,05

эстрадиола приводит к повышению общего количества фосфолипидов более, чем на 25%, причем наибольшие изменения претерпевают фракции сфингомиелина и фосфатидилинозитола, содержание которых повышается почти на 55% и 49% соответственно (табл.7).

Воздействие стероида приводит также к некоторому перераспределению фракций хроматиновых фосфолипидов, в частности, уменьшению относительного содержания фосфатидилхолина и повышению относительного содержания сфингомиелина (табл.7). Разнонаправленность изменений содержания фосфатидилхолина и сфингомиелина здесь также можно объяснить возможным гормональным усилением процесса перехода фосфорилхолина с молекулы фосфатидилхолина на молекулу сфингомиелина, что предполагается также другими авторами (Nelson et al., 1981). Известно, также, что повышение содержания сфингомиелина может оказывать дестабилизирующее влияние на хроматин и, тем самым, способствовать повышению его матричной активности при воздействии эстрадиола.

С целью выяснения возможных причин столь значительного повышения содержания фосфатидилинозитола нами проводилось также дальнейшее его изучение путем фракционирования и определения содержания полифосфоинозитидов в препаратах хроматина (табл.8). Исследования показали, что более половины содержания фосфоинозитидов обнаруживается во фракции монофосфоинозитида (т.е. фосфатидилинозитола), в то время как содержание трифосфоинозитида едва достигает до 20% (рис.1). При эстрадиоловом воздействии (через 4 часа после введения гормона) значительное повышение содержания монофосфоинозитида сопровождается заметным уменьшением содержания ди- и трифосфоинозитидов (табл.8), т.е. по-видимому, гормон главным образом действует на активность ферментов, осуществляющих взаимопревращение

полифосфоинозитидов. Соотношение трифосфоинозитид/монофосфоинозитид при этом снижается более, чем в два раза (в контроле – 0,35, при воздействии гормона – 0,16) (рис.1).

Таблица 8
Содержание фосфоинозитидов в препаратах хроматина клеток головного мозга крыс в контроле и при воздействии эстрадиола

| Фосфоинозитиды | Контроль | Эстрадиол |
|-------------------|--------------|--------------|
| | мкг/мг белка | мкг/мг белка |
| Монофосфоинозитид | 10,73±0,68 | *15,82±1,02 |
| Дифосфоинозитид | 6,15±0,42 | *3,62±0,24 |
| Трифосфоинозитид | 3,80±0,25 | *2,52±0,16 |
| Общее содержание | 20,68±1,35 | 21,96±1,42 |

* – P<0,05

Таким образом, воздействие эстрадиола *in vivo* в концентрации и экспозиции, вызывающих активацию биосинтетических процессов функциональных белков, заметно сказывается на содержании фосфолипидов в препаратах хроматина. Эти результаты созвучны с изменениями в составе фосфолипидов ядерных мембран и ядерного матрикса и свидетельствуют о том, что, видимо, некоторые пути липидного метаболизма ядер клеток головного мозга крыс находятся под контролем стероидного гормона эстрадиола.

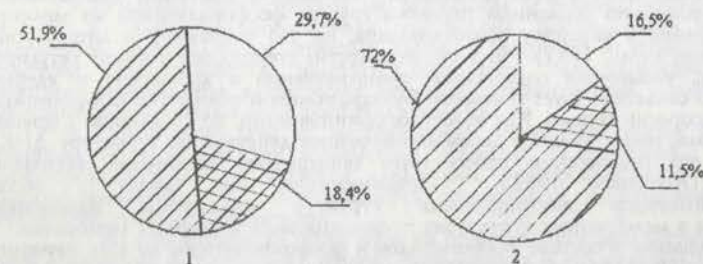


Рис.1. Процентное содержание отдельных фракций фосфоинозитидов в препаратах хроматина головного мозга крыс в контроле и при воздействии эстрадиола.

1 – контроль, 2 – воздействие эстрадиола;

▨ – монофосфоинозитид, □ – дифосфоинозитид, ▩ – трифосфоинозитид.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изменение содержания фосфатидинозитола, а также сдвиги в соотношении моно-, ди- и трифосфоинозитидов в мембранных структурах клеточных мишеней, наблюдаемые на первичном и раннем этапах действия эстрадиола, могут быть непосредственно связаны с функционированием фосфоинозитидного регуляторного механизма. С этой точки зрения, полученные нами результаты об изменениях в составе фосфоинозитидов, в особенности в синапсоммах и ядерных мембранах, представляют определенный интерес. Учитывая, что изучалось влияние гормона в концентрациях и экспозициях, приводящих к индукции функциональных белков, выявленные сдвиги могут быть результатом эстрадиоловой активации биосинтетических процессов в клетках головного мозга и могут свидетельствовать о взаимосвязи процессов стероидной активации генома и функционированием фосфоинозитидного регуляторного механизма. Эти результаты содержат научную новизну и существенно дополняют имеющиеся в литературе данные о чувствительности фосфоинозитидного пути регуляции внутриклеточного метаболизма к воздействию стероидных гормонов (Grove, Kotach, 1987; Ruzucky, Crankshaw, 1988; Brann et al, 1995).

Схожие результаты были получены также при изучении состава фосфолипидов и фосфоинозитидов внутриядерных структур — ядерного матрикса и хроматина, играющих ключевую роль в основных функциях ядра — репликации и транскрипции. Эстрадиол на раннем этапе воздействия вызывал достоверное повышение содержания этих минорных компонентов ядерного матрикса и хроматина, причем были выявлены аналогичные сдвиги в содержании отдельных фракций. На фоне заметного повышения содержания сфингомиелина, фосфатидинозитола, фосфатидилэтаноламина в обеих структурах наблюдалась резкое снижение доли фосфатидилохолина. Последнее, как было уже отмечено, вероятно, обусловлено усилением переноса группы фосфорилохолина из молекулы фосфатидилохолина в молекулу сфингомиелина, на что указывают и литературные данные (Nelson et al, 1981). По всей видимости, стероидный гормон регулирует этот процесс, увеличивая содержание сфингомиелина в хроматине и ядерном матриксе, что свидетельствует о важной функциональной роли этого фосфолипида в процессах экспрессии генома. Как известно, сфингомиелин, по сравнению с другими фосфолипидами, имеет сильное дестабилизирующее действие на структуру ДНК, а повышение его содержания способствует повышению матричной активности хроматина (Алесенко, 1982). Примечательно, что сдвиги в составе полифосфоинозитидов внутриядерных структур аналогичны изменениям, наблюдаемым в мембранных структурах — синапсоммах и ядерных мембранах.

Изменения в составе фосфолипидов и фосфоинозитидов во всех изученных субклеточных структурах выявляются на первичном и, в особенности, на раннем этапах воздействия стероида и полностью нивелируются на позднем этапе воздействия. Данный факт является дополнительным подтверждением того, что эти сдвиги связаны с эстрадиоловой активацией биосинтетических процессов белков, ферментов, так как хорошо известно, что на позднем этапе воздействия стероидов (на 24-ом часу воздействия) гормональная индукция большинства функциональных белков нивелируется и их биологическая активность возвращается к контрольному уровню.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что эстрадиол, активируя биосинтетические процессы в клетках головного мозга крыс, приводит к достоверным сдвигам в составе фосфоинозитидов во всех исследованных субклеточных структурах. Повышение содержания монофосфоинозита с одновременным снижением содержания трифосфоинозита может быть связано с эстрадиоловой регуляцией активности ферментов, ответственных за взаимопревращение полифосфоинозитидов. Разумеется, что для такого утверждения необходимы дополнительные, непосредственные эксперименты по изучению влияния эстрадиола на ферментативную активность соответствующих фосфолипид-киназ и фосфолипаз-фосфатаз, что может быть предметом отдельного исследования. Обнаруженное

нами перераспределение во фракциях фосфоинозитидов в изученных мембранных структурах должно иметь важное значение в функционировании фосфоинозитидного механизма, а количественное соотношение трифосфоинозита/монофосфоинозита может служить своеобразным показателем физиологического статуса мембран, в отношении функционирования фосфоинозитидного регуляторного пути.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что эстрадиол на раннем этапе воздействия приводит к повышению общего количества фосфолипидов синапсомом клеток головного мозга крыс, причем заметно увеличивается содержание пяти из семи выявленных фракций. Повышение содержания фосфатидинозитола — ключевого для функционирования фосфоинозитидного механизма фосфолипида, обнаруживается как на первичном, так и на раннем этапах воздействия гормона.

2. Обнаружено, что на первичном и раннем этапах воздействия гормона повышение монофосфоинозита в синапсоммах сопровождается снижением доли ди- и, в особенности, трифосфоинозита.

3. Показано, что эстрадиол как на первичном, так и, в особенности, на раннем этапах воздействия приводит к повышению содержания как общего фосфолипида, так и всех отдельных фракций в препаратах ядерных мембран клеток головного мозга крыс, что свидетельствует об универсальном и однозначном влиянии гормона.

4. Показано, что в ядерных мембранах также повышение количества монофосфоинозита сопровождается снижением содержания трифосфоинозита как на первичном, так и на раннем этапах воздействия эстрадиола.

5. Показано, что эстрадиол на первичном и раннем этапах воздействия приводит к заметному повышению содержания фосфолипидов — минорных компонентов внутриядерных структур: ядерного матрикса и хроматина. В обеих структурах обнаруживается заметное повышение сфингомиелина — липида, играющего важную роль в процессах активации транскрипции, с одновременным значительным снижением доли фосфатидилохолина.

6. Обнаружено, что во внутриядерных структурах также эстрадиол на первичном и раннем этапах воздействия приводит к повышению содержания монофосфоинозита, что является следствием межфракционных превращений полифосфоинозитидов и сопровождается снижением содержания ди- и, в особенности, трифосфоинозитидов.

7. Во всех изученных структурах на позднем этапе воздействия эстрадиола сдвиги изменений в содержании общего фосфолипида и его отдельных фракций не обнаруживаются. Это, вероятнее всего, свидетельствует о том, что выявляемые заметные сдвиги в содержании фосфолипидов и, в том числе, фосфоинозитидов, на первичном и раннем этапах воздействия гормона являются результатом гормональной активации биосинтетических процессов.

8. Обнаружено, что эстрадиол на первичном и раннем этапах воздействия приводит к заметному снижению количественного соотношения трифосфоинозита/монофосфоинозита, что не может не сказываться на функционировании фосфоинозитидного регуляторного механизма в изученных мембранных структурах. Данное соотношение можно предложить как своеобразный функциональный показатель мембран в отношении функционирования фосфоинозитидного механизма.

Список работ, опубликованных по материалам диссертации

1. Геворкян Э.С., Арутюни И.Г., Явоян Ж.В., Акопян Н.Р. Сдвиги в составе фосфоинозитидов мембран синапсомом головного мозга крыс при воздействии эстрадиола // Тез. докл. конф. "Биология старения", посв. 50-летию основания ХГУ, Харьков, 1994. - с. 23.

2.Геворкян Э.С., Явроян Ж.В., Аруруни И.Г., Акопян Н.Р. Действие эстрадиола на состав фосфоинозитидов синапсом головного мозга крыс // Вопр. мед. химии. - 1995. - № 5. - с. 35-37.

3. Gevorgian E., Yavroyan Zh., Arzruni I.,Tadevosian Yu., Hakobian N. Interdepeny between the mechanisms of protein induction and protein modification caused by estradiol // 9-th International conf. on second messengers & phosphoproteins, 1995. Nashville, Tennessee, USA, № 269.

4. Аруруни И.Г., Акопян Н.Р. Действие эстрадиола на содержание фосфолипидов хроматина из мозга крыс // Мат. науч. конф. посв. 30-летию основ. отдела биофизики биол. фак. ЕГУ, Ереван, 1996. - с. 27.

5. Явроян Ж.В., Акопян Н.Р. Действие эстрадиола на состав полифосфоинозитидов ядерных мембран клеток головного мозга крыс // Мат. науч. конф. посв. 30-летию основ. отдела биофизики биол. фак. ЕГУ, Ереван, 1996. - с. 64.

6. Геворкян Э.С., Акопян Н.Р., Явроян Ж.В., Аруруни И.Г., Демирханян Л.О. Состав полифосфоинозитидов ядерных мембран клеток головного мозга крыс при воздействии эстрадиола // Мат. науч. конф., посв. 30-летию основ. инст. мол. биологии НАН РА, Ереван, 1997. - с. 22.

7. Геворкян Э.С., Явроян Ж.В., Аруруни И.Г., Акопян Н.Р. Демирханян Л.О. Действие эстрадиола на состав фосфоинозитидов ядерных мембран клеток головного мозга крыс // Укр. биохим. ж. -1998. -Т. 70. -№ 1. - с. 53-58.

8. Геворкян Э.С., Аруруни И.Г., Явроян Ж.В., Акопян Н.Р., Демирханян Л.О. Действие эстрадиола на состав фосфолипидов ядерного матрикса клеток головного мозга крыс // Вопр. мед. химии. -1998. -№ 4. - с.

9.Геворкян Э.С., Акопян Н.Р., Аруруни И.Г., Явроян Ж.В., Демирханян Л.О. Действие эстрадиола на состав фосфолипидов хроматина клеток головного мозга крыс // Вопр. мед. химии, (в печати).

10. Акопян Н.Р. Действие эстрадиола на состав фосфоинозитидов ядерного матрикса клеток головного мозга крыс // Ученые записки ЕГУ, (в печати).

ԷՍՏՐՈՒԴԻՈՒԼԻ ԱԶԳԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ԳԼԽՈՒՂԵՂԻ ԲԶԻՋՆԵՐԻ ՈՐՈՇ ԵՆԹԱԲԶՋԱՅԻՆ ԿԱՌՈՑՎԱԾՔՆԵՐԻ ՖՈՍՖՈՒՆՈՋԻՏԻԳՆԵՐԻ ՎՐԱ

ԱՄՓՈՓԱԳԻՐ

Հանգուցային բառեր՝ *ներբջջային կարգավորում, էստրադիոլ, ֆոսֆոլիպիդներ, ֆոսֆոհինոզիտիդային ուղի, գլխուղեղ, սինապտոսոմ, կորիզաթաղանթ, կորիզային մատրիքս, քրոմատին:*

Աշխատանքը նվիրված է ժամանակակից մոլեկուլային կենսաբանության և կենսաքիմիայի արդիական հիմնահարցերից մեկին՝ ներբջջային կարգավորման մոլեկուլային մեխանիզմների ուսումնասիրությանը: Հետազոտության առարկա են դարձել առևտի գլխուղեղի բջիջներից անջատված ֆրակցիաներում՝ ինտակտ սինապտոսոմներում, կորիզաթաղանթներում, կորիզային մատրիքսում և քրոմատինում ֆոսֆոլիպիդների և, հատկապես, ֆոսֆոհինոզիտիդների կազմում տեղի ունեցող քանակական և որակական փոփոխությունները էստրադիոլի in vivo ազդեցության տարբեր ժամկետների դեպքում: Պարզվել է, որ էստրադիոլն իր ազդեցության առաջնային և, առանձնապես, վաղ փուլում բոլոր հետազոտվող մուշկներում հանգեցնում է ֆոսֆոլիպիդների ընդհանուր պարունակության, ինչպես նաև առանձին ֆրակցիաների քանակական փոփոխությունների, ինչը վկայում է գլխուղեղի բջիջներում լիպիդների մետաբոլիզմի հորմոն-զգայունության մասին: Ենթադրվում է, որ ազդեցության առաջնային և վաղ փուլերում ի հայտ եկող այս փոփոխությունները լիպիդների և ֆունկցիոնալ սպիտակուցների կենսասինթետիկ պրոցեսների ակտիվացման արդյունք են: Ստացված արդյունքների հիման վրա տրիֆոսֆոհինոզիտիդ/մոնոֆոսֆոհինոզիտիդ քանակական հարաբերությունը առաջարկվում է որպես թաղանթների ֆոսֆոհինոզիտիդային կարգավորիչ մեխանիզմի գործունեության առումով յուրահատուկ ֆունկցիոնալ ցուցանիշ:

Ատենախոսության մեջ ներկայացված արդյունքները ունեն ինչպես հիմնարար գիտական, այնպես էլ գործնական նշանակություն:

և. Դավ

Տպագրված է ՀՀ ԲՈՀ-ի պատվերով

Հանձնված է տպագրության 17.06.98 թ: Պատվեր 112 Տպաքանակ60:

Տպագրված է «Դավիթ» կոոպերատիվի տպարանում:
Երևան, Տերյան 72: