

А. С. ОГАНЕСЯН

К ВОПРОСУ О МЕХАНИЗМЕ ДЕЙСТВИЯ ИНСУЛИНА

Многочисленными исследованиями установлено, что инсулин ускоряет поглощение глюкозы мышечной тканью. По мнению Кори и сотр. [1] это объясняется устранением ингибирующего действия β -липопротеиновой субстанции на гексокиназу. Дальнейшие наблюдения не подтвердили гексокиназную теорию действия инсулина.

Исследования последних лет показали, что действие инсулина ограничивается его влиянием на мембранный барьер.

Левин и сотр. показали [2], что проницаемость этого барьера в отношении глюкозы повышается под действием инсулина. По их данным, инсулин ускоряет транспорт не только глюкозы, но и некоторых ее неметаболизирующихся изомеров через клеточную мембрану. Парк и сотр. [3, 5] также установили усиление транспорта глюкозы под влиянием инсулина: трансмембранный перенос глюкозы под действием инсулина настолько усиливается, что превышает диапазон внутриклеточного фосфорилирования. Вследствие этого внутри клетки накапливается свободная глюкоза в значительном количестве. Исследования этих авторов подтвердили данные Левина и сотр. относительно мембранного действия инсулина и показали, что гексокиназная реакция не играет роли в трансмембранном переносе глюкозы.

Ряд исследований Рандл и сотр. [4] показал, что как инсулин, так и аноксия и некоторые вещества, нарушающие окислительное фосфорилирование (динитрофенол, Na-цианид, Na-арсенит), ускоряют трансмембранный перенос глюкозы. На основании своих исследований они приходят к заключению, что макроэргические фосфорные соединения, образующиеся в ходе окислительного фосфорилирования, ограничивают транспорт глюкозы через клеточную мембрану.

В течение ряда лет, работая в области биохимии и физиологии почек, мы особое внимание уделяли вопросам транспорта глюкозы, неорганических фосфатов и ионов натрия и калия в почечных канальцах, а также в мышечной ткани. Результаты этих исследований показали, что инсулин, ускоряет реабсорбцию глюкозы и натрия в почках. С другой стороны строфантин, который по нашим данным и по данным ряда авторов, подавляет транспорт ионов натрия в почечных канальцах, вызывает также нарушение реабсорбции глюкозы [6]. Нами было установлено, что глюкоза способствует реабсорбции натрия в почечных канальцах и, наоборот. Следовательно, между реабсорбцией глюкозы и ионов натрия в почечных канальцах имеется тесная связь.

По литературным данным в процессе транспорта ионов натрия и

калия в эритроцитах [7] и в нервной ткани [9] принимает участие аденозинтрифосфатаза (АТФ-аза). Имея ввиду результаты наших прежних исследований, а также литературные данные относительно влияния инсулина и строфантина на транспорт глюкозы и натрия в почечной и мышечной ткани, мы задались целью изучить изменение активности аденозинтрифосфатазы под действием инсулина и строфантина в почечной и мышечной тканях и выяснить участие этого фермента в процессах транспорта глюкозы и ионов натрия в указанных тканях.

Опыты были проведены на срезах почек и скелетных мышц белых крыс. Отдельные опыты, связанные с введением аденозинтрифосфата (АТФ) и инсулина, были проведены на нормальных и депанкреатизированных собаках с выведенными мочеточниками по способу Павлова. Инсулин и АТФ (натриевая соль) вводили внутривенно на физиологическом растворе. Активность АТФ-азы определяли по Бонтингу и сотр. [9] с некоторыми изменениями, описанными нами ранее [10]. Полученные данные приводятся в соответствующих таблицах.

Таблица 1

Изменение активности АТФ-азы почечной и мышечной ткани (срезы)
под действием инсулина (мг Р/гр ткани/час)

П о ч е ч н а я т к а н ь						М ы ш е ч н а я т к а н ь		
Корковая часть			Мозговая часть			Контроль	Инсулин	Изменение активности фермента в %
Контроль	Инсулин	Изменение активности фермента в %	Контроль	Инсулин	Изменение активности фермента в %			
0,53 ± 0,03 (12)	0,63 ± 0,04 p < 0,01 (12)	18,8	0,51 ± 0,05 (12)	0,62 ± 0,05 p < 0,01 (12)	21,1	0,44 ± 0,04 (12)	0,57 ± 0,04 p < 0,01 (12)	29,5

Как видно из данных таблицы 1, активность АТФ-азы под действием инсулина повышается в почечной ткани в среднем на 20%, а в мышечной на 29,5%.

Данные таблицы 2 показывают, что в присутствии строфантина активность АТФ-азы ингибируется как в почечной, так и в мышечной тканях. Причем это ингибирование одинаково выражено как в отношении корковой, так и мозговой части почек.

Имея ввиду, что инсулин усиливает активный транспорт глюкозы и ионов натрия в почечных канальцах и глюкозы в мышечной ткани, а также повышает активность АТФ-азы, надо было полагать, что в процесс транспорта вовлекается также и АТФ. Для проверки этого предположения АТФ был введен внутривенно здоровым собакам и собакам, страдающим сахарным диабетом (депанкреатизированным). У здоровых

Таблица 2

Изменение активности АТФ-азы почечной и мышечной ткани (срезы)
под действием строфантина, 10^{-3} ммоль, (Р мг/гр ткани/час)

П о ч е ч н а я т к а н ь						Мышечная ткань		
Корковая часть			Мозговая часть			Контроль	Строфантин	% ингибирования фермента
Контроль	Строфантин	% ингибирования фермента	Контроль	Строфантин	% ингибирования фермента			
$0,47 \pm 0,07$ (14)	$0,35 \pm 0,06$ $p < 0,01$ (14)	25,5	$0,41 \pm 0,05$ (14)	$0,28 \pm 0,05$ $p < 0,01$ (14)	31,7	$0,4 \pm 0,06$ (14)	$0,3 \pm 0,06$ $p < 0,01$ (14)	25

собак АТФ вызывал незначительное повышение уровня сахара крови. При введении его совместно с инсулином он не оказывал влияния на гипогликемизирующее действие последнего. Однако, при введении АТФ животным, страдающим сахарным диабетом, наблюдалось значительное изменение содержания глюкозы крови и мочи.

Под действием АТФ наблюдалось понижение уровня сахара крови и мочи (табл. 3). При введении АТФ вместе с инсулином отмечается значительное усиление и удлинение гипогликемического эффекта инсулина. Интересно отметить, что под действием АТФ наблюдается также повышение чувствительности животного страдающим сахарным диабетом к инсулину, т. е. гипогликемический эффект инсулина усиливается после применения АТФ (табл. 3, собака 3).

Следует отметить, что у депанкреатизированных собак чувствительность почек к инсулину значительно повышается, в то время как у нормальных собак при введении инсулина отмечается восстановление диуреза до исходного уровня, после его кратковременного понижения, у депанкреатизированных—наблюдается прогрессивное падение диуреза до конца опыта на протяжении двух часов.

С целью изучения влияния АТФ на поглощение глюкозы непосредственно мышечной тканью, мы вводили АТФ в бедренную артерию у собак под нембуталовым наркозом. При этом артерио-венозная разница по глюкозе у здоровых собак повышалась в незначительной степени, а у депанкреатизированных—поглощение глюкозы мышцами значительно возрастало (табл. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что под действием АТФ повышается способность мышц животного, страдающего сахарным диабетом, в отношении поглощения глюкозы из притекающей крови. Следовательно, АТФ повышает активность глюкозо-транспортного механизма клеточной мембраны при сахарном диабете.

Как показывают приведенные данные, инсулин повышает, а строфантин, наоборот, подавляет активность АТФ-азы почечной и мышечной тканей. Как вытекает из наших прежних исследований, а также ряда ли-

Таблица 3

Влияние АТФ на содержание глюкозы крови и мочи у собак с экспериментальным диабетом

Условия опыта	Содержание глюкозы крови в мг %о опред., через каждые 15 минут								Количество глюкозы в мг, выделенное с мочой за каждые 15 минут							
	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3	4	5	6	7	8
Собака № 1																
Контрольный опыт	563	580	595	580	575	581	575	568	36,0	38,6	38,2	31,0	33,9	28	34,4	25,8
Инсулин 4 МЕ	521 ↓	528	392	364	495	507	520	530	46,7 ↓	49,5	28,2	33,6	18,2	10,5	6,3	6,2
АТФ — 20 мг	550 ↓	446	444	376	396	354	454	438	79 ↓	60,3	23,7	17,6	18,7	14,3	12,9	12,0
Инсулин — МЕ + АТФ — 20 мг	602 ↓	598	450	493	236	213	185	205	61,2 ↓	50,2	32,9	21,0	18,6	10,0	8,8	7,2
Собака № 2																
Контрольный опыт	419	420	450	425	430	430	425	—	18,1	20,0	15,6	18,2	17,5	16,2	15,6	16,2
Инсулин — 3МЕ	452 ↓	385	328	330	328	320	300	—	106,4	54,0	20,2	9,9	1,7	—	—	—
Инсулин — 3МЕ + АТФ — 20 мг	432 ↓	397	389	367	287	246	192	—	11,2 ↓	7,5	6,0	—	—	—	—	—
Собака № 3																
Контрольный опыт	471	480	450	500	493	500	500	490								
Инсулин 5 МЕ	676 ↓	658	678	674	660	621	565	511								
Инсулин — 5 МЕ + АТФ — 20 мг	524 ↓	524	505	290	230	217	260	360								
Инсулин — 5 МЕ	426 ↓	407	405	215	164	127	177	186								

Примечание: стрелки показывают время введения инсулина и АТФ.

Артерио-венозная разница содержания глюкозы крови после введения АТФ в левую бедренную артерию — у депанкреатизированных собак

Условия опыта		Содержание глюкозы крови в мг ‰							Артерио-венозная разница глюкозы в мг ‰								
		до введения АТФ (через минуты)			после введения АТФ (через минуты)				до введения АТФ (через минуты)			после введения АТФ (через минуты)					
		0	10	20	5	10	20	30	40	0	10	20	5	10	20	30	40
Контрольный опыт	артерия	388	390	388	392	390	385	387		5	4	3	6	5	2	5	
	вена	383	386	385	386	385	383	382									
.	артерия	435	429	430	435	428	430	427		5	3	6	2	6	2	4	
	вена	430	426	424	433	422	428	423									
АТФ 20 мг	артерия	388	390	388	405	439	437	431		5	4	2	15	53	49	43	
	вена	383	386	386	390	386	388	388									
.	артерия	430	428	432	429	404	400	407	409	3	5	4	31	14	15	13	17
	вена	427	423	428	392	390	385	394	392								
АТФ 80 мг	артерия	560	563	570	632	639	672	688	698	5	4	4	81	108	68	97	71
	вена	555	559	566	550	531	604	591	627								
АТФ 20 мг	артерия	455	454	459	445	478	484	491		-21	-24	-19	-25	23	34	41	
	вена	476	478	478	470	455	450	450	—								

Примечание: стрелки показывают время введения АТФ.

тературных данных, инсулин усиливает транспорт глюкозы и натрия как в почках, так и в мышечную ткань. Строфантин, наоборот, нарушает транспорт этих веществ в указанных тканях. Следовательно, АТФ-аза, активность которой довольно высока в клеточной мембране указанных тканей принимает активное участие в процессе транспорта глюкозы и натрия в них.

По нашим данным, АТФ способствует также транспорту глюкозы в почках и в мышечной ткани и потенцирует гипогликемический эффект инсулина. Таким образом, система АТФ—АТФ-аза играет важную роль в процессе транспорта глюкозы и представляет часть глюкозо-транспортирующего механизма в почках и в мышечной ткани.

Как было отмечено выше, по данным Рандл сотр. [4] инсулин, аноксия и некоторые яды, подавляющие окислительное фосфорилирование, ускоряет транспорт глюкозы через клеточную мембрану. Авторы это явление объясняют нарушением синтеза АТФ в указанных условиях и устранением подавляющего действия АТФ на транспорт глюкозы.

Как видно из приведенных выше данных, АТФ не только не тормозит, а наоборот, способствует транспорту глюкозы и усиливает действие инсулина в почках и в мышечной ткани у депанкреатизированных собак. Следовательно, усиление транспорта глюкозы под действием инсулина и агентов ингибирующих окислительное фосфорилирование, а также в условиях аноксии, нельзя объяснить недостатком АТФ в тканях. В этом можно убедиться, если учесть, что более длительное инкубирование диафрагмы в условиях аноксии приводит к понижению транспорта глюкозы [11], что можно объяснить истощением запасов АТФ в мышечной ткани.

Известно, что при сахарном диабете нарушается именно трансмембранный перенос глюкозы [5], активность же гексокиназной реакции внутри клетки не подавляется, как это предполагали Кори и сотр. [1]. В тканях животного, страдающего сахарным диабетом, ощущается дефицит АТФ, вследствие нарушения его синтеза. В свете этих данных гипогликемический эффект АТФ может быть обусловлен его стимулирующим действием глюкозо-транспортирующей системы.

Исходя из вышеизложенного, мы предлагаем следующую гипотетическую схему транспорта глюкозы с участием инсулина в этом процессе (рис. 1).

Как видно из приведенной схемы, под действием мембранной АТФ-азы АТФ расщепляется и выделенная энергия передается переносчику глюкозы (Саггier). Благодаря этой энергии глюкозо-транспортирующая способность Саггier'a поддерживается на определенном уровне. Этот Саггier на поверхности мембраны клетки связывается с глюкозой, образуя при этом комплекс Саггier-глюкоза, который двигается к внутренней поверхности мембраны, где происходит расщепление этого комплекса. При этом глюкоза в свободном виде поступает в цитоплазму, а Саггier возвращается к исходному положению для переноса новой молекулы глюкозы.

Согласно этой схеме, инсулин влияет на мембранную АТФ-азу, повышая активность этого фермента. В этих условиях усиливается распад АТФ, следовательно, выделяется и большое количество энергии, которая передается Carrier'у, повышая его активность в отношении транспорта глюкозы. Таким образом под действием инсулина возрастает глюкозо-

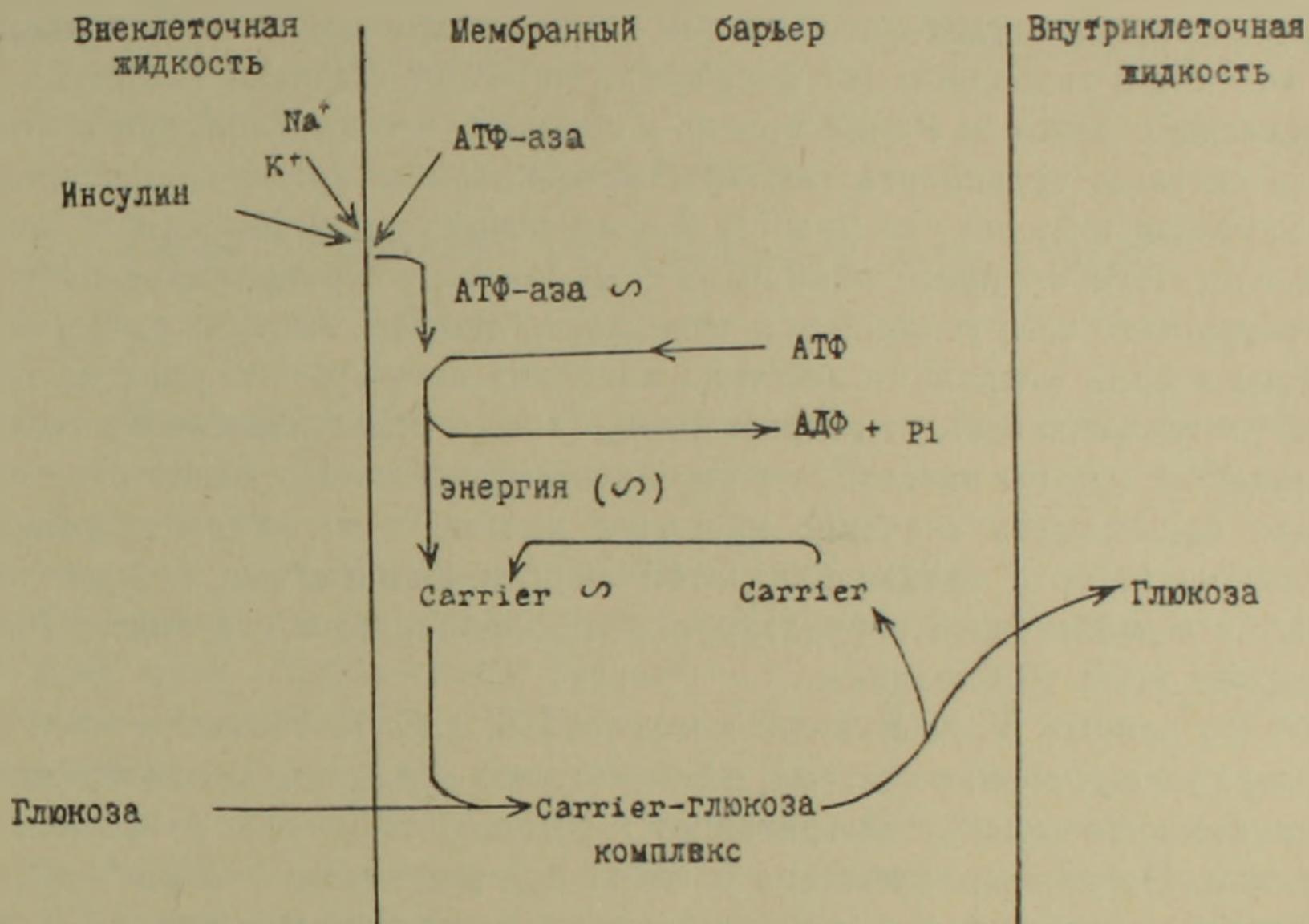


Рис. 1.

транспортирующая способность переносчика, в результате чего усиливается и транспорт глюкозы. Усиленный транспорт глюкозы и ее утилизация клеткой ускоряет синтез АТФ, который расходуется в процессе самого транспорта глюкозы и обеспечивает дальнейшее действие этого механизма. В нормальных условиях в организме под непрерывным действием инсулина активность АТФ-азы и АТФ, следовательно и Carrier'а глюкозы, поддерживается на определенном уровне, что способствует преодолению мембранного барьера и обеспечению транспорта глюкозы. В условиях недостаточности инсулина (аллаксановый диабет), как показали результаты наших предварительных опытов, активность АТФ-азы подавляется. Кроме того, при сахарном диабете нарушается и синтез АТФ в тканях. В этих условиях, по-видимому, имеет место понижение активности переносчика глюкозы, в результате чего подавляется его способность в отношении транспорта глюкозы из межклеточного пространства в клетку.

В отношении механизма действия инсулина на транспорт глюкозы в литературе имеется ряд предположений.

Фишер [12] считает, что инсулин ускоряет расщепление комплекса Carrier-глюкоза. По Барнетту и Боллу [13] транспорт глюкозы осуществляется путем пиноцитоза. Однако, это явление не наблюдается в мы-

шечной ткани, являющейся высокоинсулиночувствительной. По мнению Рандл и Смит [4] переносчик обладает глюкозо-транспортирующей способностью только в свободном виде. В аэробных условиях Саггег фосфорилируется АТФ-ом, что приводит к понижению его глюкозо-транспортирующей способности. Эти авторы считают, что инсулин либо препятствует взаимодействию переносчика с АТФ, либо ускоряет расщепление комплекса Саггег-фосфат и тем самым способствует сохранению переносчика в свободном (от фосфата) состоянии. Левин и Голштейн [14] согласны с мнением Рандл и сотр. и считают, что инсулиночувствительные системы транспорта глюкозы ингибированы каким-то веществом. Введенный инсулин связывается с этим веществом и тем самым устраняет его ингибирующее влияние на глюкозо-транспортирующую систему, в результате чего усиливается транспорт глюкозы. Авторы вышеупомянутых теорий механизма действия инсулина активному характеру транспорта глюкозы отводят второстепенное место, вследствие чего инсулину придается как бы пассивная роль в этом процессе. По нашему мнению, надо подчеркнуть значение инсулина именно в активном транспорте глюкозы, который связан с затратой энергии. Наша схема, которая нуждается в дальнейшей корректировке и дополнении, в основном удовлетворяет этим требованиям.

По данным Г. Х. Бунятына и сотр. [15] и С. Г. Генеса и сотр. [16], центральная нервная система, особенно кора головного мозга оказывает значительное влияние на транспорт и обмен глюкозы под действием инсулина. По данным Бунятына и сотр., под действием центральных импульсов может изменяться проницаемость клеточной мембраны. Об этом свидетельствует условно-инсулиновая гипогликемия и купирование гипогликемического действия инсулина при определенных функциональных состояниях коры головного мозга. Не исключена возможность, что корковые механизмы оказывают влияние на активность АТФ-азы, Саггег'а и других звеньев транспортного механизма глюкозы.

Ряд авторов [17] предполагали, что вазопрессин, содержащий—S-S-связи, свое специфическое действие проявляет путем реагирования с SH-группой рецепторных белков в тканях. Установлено, что физиологическое действие инсулина связано с наличием в его молекуле S-S-связи. Однако известно, что введенный инсулин связывается с тканями (*in vivo* и *in vitro*) и тем самым оказывает свое специфическое действие в отношении транспорта глюкозы.

Мирский и Перисутти [18] показали, что предварительная обработка жировой ткани растворами препаратов, ингибирующих сульфгидрильные группы, приводит к понижению эффекта инсулина в отношении транспорта глюкозы. По-видимому, инсулин, на подобие вазопрессина, своей S—S-группировкой реагирует с SH-группой рецепторного белка в тканях и тем самым оказывает свое специфическое действие. Не исключена возможность, что рецепторным белком в тканях для инсулина является АТФ-аза, активность которой изменяется параллельно с изменением транспорта глюкозы при сахарном диабете и под действием

инсулина. Известно, что под действием вазопрессина повышается реабсорбция воды в почечных канальцах. Интересно отметить, что подобное явление наблюдалось нами и другими авторами при введении инсулина, содержащего в своем составе, как и вазопрессин, S—S-связи.

Исследования в этом направлении продолжаются.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 15.II 1963 г.

Ա. Ս. ՀՈՎՀԱՆՆԻՍՅԱՆ

ԻՆՍՈՒԼԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՄԵԽԱՆԻԶՄԻ ՀԱՐՑԻ ՇՈՒՐՋԸ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է ինսուլինի և ստրոֆանտինի ազդեցությունը երիկամային ու մկանային հյուսվածքների ադենոզինտրիֆոսֆատազայի (ԱՏՖ-ազա) ակտիվության վրա:

Ստացված տվյալները ցույց են տվել, որ ինսուլինի ազդեցության տակ նկատվում է ԱՏՖ-ազայի ակտիվության բարձրացում, իսկ ստրոֆանտինի ազդեցության տակ, ընդհակառակը՝ իջեցում:

Ադենոզինտրիֆոսֆատը (ԱՏՖ) շաքարախտով հիվանդ շների մոտ ունի հիպոգլիկեմիկ ազդեցություն, իսկ ինսուլինի հետ միասին սրսկելու դեպքում ուժեղացնում է վերջինիս հիպոգլիկեմիկ ազդեցությունը: Նկատի ունենալով նաև մեր նախկին հետազոտությունների արդյունքները, ենթադրվում է, որ ԱՏՖ—ԱՏՖ-ազա սիստեմը կարևոր և անմիջական մասնակցություն ունի գլյուկոզայի ու նատրիումի տրասմեմբրանային փոխադրման պրոցեսում:

Ստացված տվյալների հիման վրա առաջարկվում է բջջի թաղանթով գլյուկոզայի փոխադրման վերաբերյալ համապատասխան սխեմա:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Krahl M. E. and Cori C. F., J. biol. Chem., 170, 607, 1947.
2. Levine R. and Goldstein M. S. Brookhaven Symposium in Biology, 5, 73, 1952.
3. Park C. R. and Johnson L. H. Am. J. Physiol. 182, 17, 1955.
4. Randle P. J. and Smith G. H. Mechanism of Action of Insulin, Oxford, 1960.
5. Park C. R. and Bornstein J. and Post R. L. Am. J. Physiol. 182, 12, 1955.
6. Оганесян А. С. Изв. АН АрмССР, сер. биол. науки, 15, 39, 1962.
7. Post R. L. and Albright C. D. Membrane Transport and Metabolism, p. 219, Pragua, 1960.
8. Skou F. C. Membrane transport and Metabolism, p. 228. Pragua, 1960.
9. Bonting S. L., Simon K. A. and Hawkins N. M. Arch. Biochem. Biophys. 95, 416, 1961.
10. Оганесян А. С. Доклады АН АрмССР, 35, 177, 1962.
11. Morgan H. E., Randle P. J. and Ragen D. M., Biochem. J., 73, 573, 1959.
12. Fisher R. B. цитиров. по R. Levine, Diabetes, 10, 421, 1961.
13. Barnett R. J. and Ball E. G. Biochem. Biophys. Citol. 8, 83, 1960.
14. Levine R., Diabetes, 10, 421, 1961, In Clinical Endocrinol. Ed. by E. Aswood, New York, 1959.

15. Бунятян Г. Х. *Вопр. биохимии*, 1, 5, 1960.
16. Генес С. Г. *Пробл. эндокринолог. и гормонотер.*, 16, 1, 77, 1955.
17. Fong C. T. O., Silver L., Cristmann D. R. and Schwarz J. L. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 46, 1273, 1960.
18. Mirsky A. and Perisutti G. *Biochem. Biophys. Acta*, 62, 490, 1962.