

С. Г. МОВСЕСЯН, М. Г. УРГАНДЖЯН, Р. Г. КАМАЛЯН

ДЕЙСТВИЕ ИНСУЛИНА НА ОКИСЛЕНИЕ ЯНТАРНОЙ КИСЛОТЫ
ИЗОЛИРОВАННОЙ ДИАФРАГМОЙ КРЫС

Кребс и Эглстон [1] впервые установили, что инсулин стимулирует окислительные процессы в изолированной грудной мышце голубей в присутствии кипяченного мышечного экстракта и каталитических количеств некоторых субстратов цикла трикарбоновых кислот. На основании полученных данных они заключили, что инсулин оказывает каталитическое действие на один из этапов лимоннокислого цикла.

Стимулирующее влияние инсулина на цикл трикарбоновых кислот вскоре подтвердилось исследованиями других авторов, проведенных на разных животных в условиях *in vivo* и *in vitro* [2—5].

По мнению Райса и Эванса [6] механизм каталитического действия инсулина не совсем ясен. Они, а также другие авторы [7] получили результаты, свидетельствующие о том, что инсулин повышает окислительный обмен вначале за счет продуктов окисления углеводов, т. е. пировиноградной кислоты [6, 7], а затем действует на ферментативные системы, обеспечивающие превращения фумаровой и щавелевоуксусной кислот [6].

На основании ряда данных Фроман и сотр. [8], высказали мысль о том, что при диабете блокируется включение пирувата в цикл Кребса, а инсулин снимает этот эффект.

Многочисленными исследованиями, в частности, работами Очоа и Кори [9, 10] установлено, что цикл трикарбоновых кислот сопряжен с окислительным фосфорилированием. В этом аспекте определенный интерес представляют исследования Каплана и Гринберга [11, 12], касающиеся образования АТФ под действием инсулина и подавления синтеза АТФ малонатом у интактных животных.

При совместном применении малонат ингибирует гипогликемический эффект инсулина, а в отсутствии последнего он вызывает кратковременное повышение количества глюкозы в крови [5].

Приведенные данные свидетельствуют о том, что действие инсулина на цикл трикарбоновых кислот затормаживается малонатом на уровне янтарной кислоты, так как последний является сильным ингибитором сукциндегидрогеназы.

Для более детального изучения этого вопроса мы задались целью изучить влияние инсулина на окисление самой янтарной кислоты в изолированной мышечной ткани крыс.

Методика. Опыты ставили на изолированных гемидиафрагмах крыс весом 80—150 г по методу Рандля и Смита [13]. Животных оставляли голодными на 16—20 ч. до опыта. Диафрагму отделяли в течение 1,5—2

мин. и погружали на 3—5 мин. в фосфатный буфер (рН-7,45), который непрерывно насыщали кислородом. Затем извлекали гемидиафрагмы, высушивали фильтровальной бумагой, взвешивали на торсионных весах (брали 100 мг) и переносили в сосудики Варбурга для определения дыхания. Инкубационная среда состояла из 0,06М Na, К—фосфатного буфера (рН—7,45) $MgSO_4$ 6,5 мкм/мл. Янтарную кислоту и кристаллический цинк-инсулин добавляли в количестве 12,7 мкм/мл и 1,1 ед/мл соответственно. Объем инкубационной жидкости — 2 мл. Газовая фаза — 100% O_2 .

Результаты опытов и обсуждение. Прежде чем приступить к решению поставленного вопроса интересно было выяснить степень окисления янтарной кислоты изолированной диафрагмой крыс. Для истощения ткани от эндогенных источников энергии предварительно инкубировали ее в течение 1 ч. Несмотря на это эндогенное дыхание активно продолжалось и в течение второго часа (табл. 1). Более длительная инкубация не имела смысла, так как возможное изменение реакции среды, а также падение активности окислительных ферментов могли бы отрицательно отразиться на результатах опытов.

Результаты наших исследований показали (табл. 1), что поглощение кислорода при добавлении янтарной кислоты повышается в среднем на 7,24 мкм, по сравнению с контрольными опытами ($p < 0,01$). Эти данные показывают, что на фоне высокого эндогенного дыхания окисление янтарной кислоты в изолированных гемидиафрагмах протекает довольно слабо. По-видимому, здесь имеет место определенная конкуренция между эндогенными субстратами и добавленной янтарной кислотой за общий акцептор водородных ионов, а также ее проникновение.

Т а б л и ц а 1

Поглощение кислорода изолированной диафрагмой крыс в мкм на 1 г свежей ткани в течение 1 ч. инкубации

Эндогенное дыхание	Янтарная кислота	
54,46	58,84	61,94
47,54	55,4	44,39
54,15	64,23	71,53
60,98	71,54	64,22
	65,78	55,42
	62,5	58,87
$54,3 \pm 4,74$ (4)	$61,54 \pm 7,15$ (12) $P < 0,01$	

Т а б л и ц а 2

Поглощение кислорода изолированной диафрагмой крыс в мкм на 1 г свежей ткани в течение 1 ч. инкубации

Янтарная кислота	Янтарная кислота + инсулин	
12,6 мкм/мл	12,7 мкм/мл + 1,1 ед/мл	
65,78	71,53	74,06
62,5	64,22	67,21
61,94	55,42	62,58
44,39	58,87	64,05
		80,3
		65,1
		59,57
		70,26
$60,58 \pm 7,61$ (8)	$67,95 \pm 6,26$ (8) $P < 0,01$	

Результаты, касающиеся действия инсулина на окисление янтарной кислоты изолированной диафрагмой крыс, приведены в табл. 2. Полученные данные показывают, что инсулин в количестве 1,1 ед/мл значительно повышает окисление янтарной кислоты гемидиафрагмой крыс

($p < 0,01$). Так, например, в присутствии одной янтарной кислоты диафрагма поглощает в среднем $60,58 \pm 7,61$ мкм кислорода на 1 г свежей ткани в течение 1 ч., а при добавлении инсулина в количестве 1,1 ед/мл этот уровень возрастает до $67,95 \pm 6,26$ мкм.

В дальнейшем перед нами стояла задача выяснить, происходит ли повышение употребления кислорода под действием инсулина за счет усиления окисления янтарной кислоты, или это является результатом активирования эндогенного дыхания.

Полученные данные показывают (рис. 1), что инсулин не оказывает заметного влияния на эндогенное дыхание.

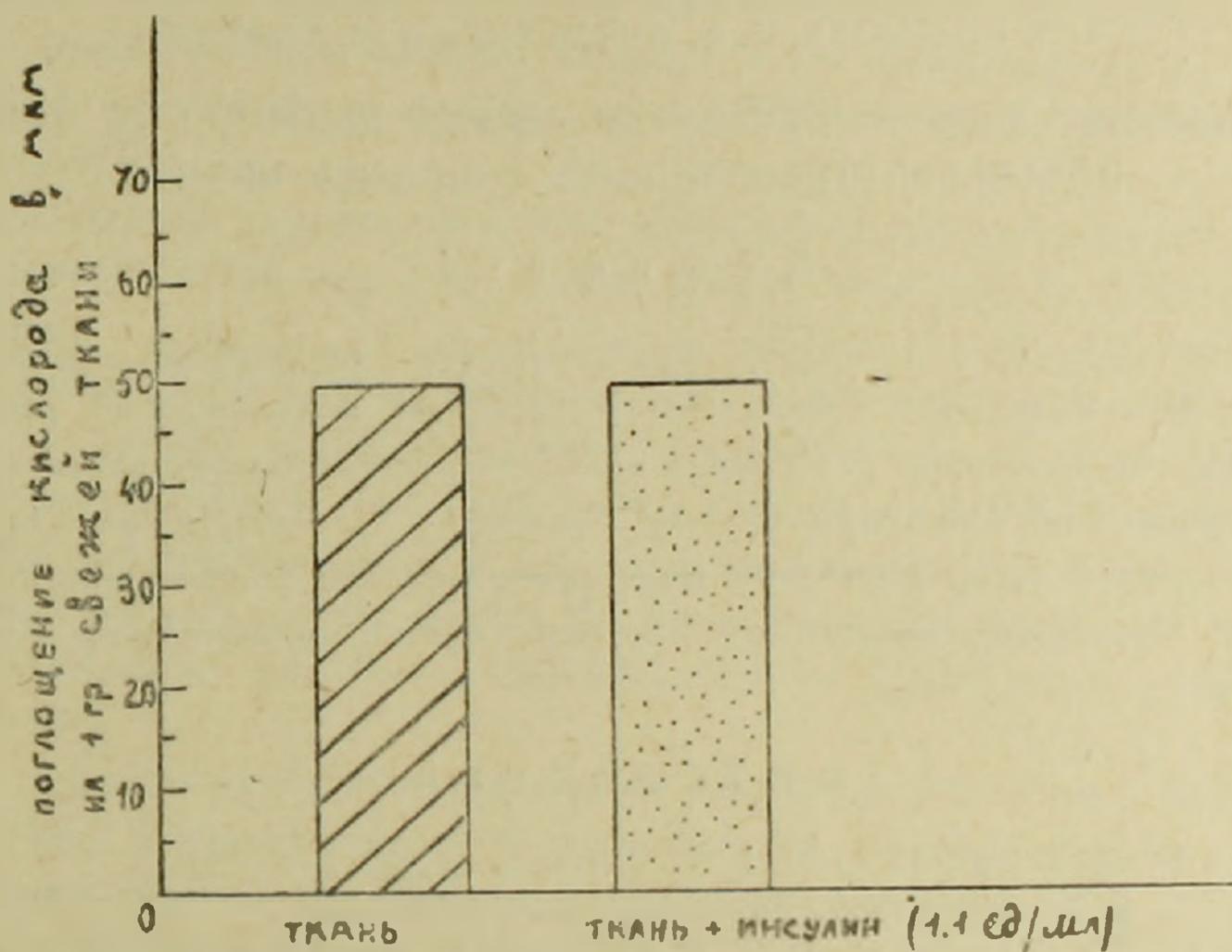


Рис. 1. Действие инсулина на эндогенное дыхание в течение часовой инкубации.

Следовательно, повышенный уровень утилизации кислорода диафрагмой под действием инсулина обусловлен окислением янтарной кислоты.

Известно, что сукциндегидрагаза как один из компонентов сукциноксидазной системы локализована в митохондриях. С другой стороны, вопрос проникновения инсулина через клеточные мембраны ставится под сомнение. Об этом свидетельствует и то, что инсулин не оказывает влияния на течение эндогенного дыхания в наших опытах (рис. 1). Следовательно, непосредственное действие инсулина на сукциноксидазную систему не представляется возможным.

Многочисленными исследованиями [14—16] доказано, что в механизме гипогликемического действия инсулина определяющее значение имеет повышение проницаемости клеточных мембран в отношении глюкозы. Следует отметить, что помимо глюкозы инсулин оказывает аналогичное действие и в отношении других веществ [13, 17—21]. По-видимому, основное действие инсулина на окисление янтарной кислоты следует

искать в усилении проникновения последней в мышечную ткань (диафрагма), где она подвергается дальнейшим превращениям. Хотя инсулину приписывают определенную роль в регуляции окислительного и фосфорного обмена [1—8, 11—12], тем не менее исследования ряда авторов, а также полученные нами данные не позволяют объяснить механизм его действия на окисление янтарной кислоты непосредственным его участием во внутриклеточных ферментативных процессах.

Институт биохимии
АН АрмССР

Поступило 27.VII 1964 г.

Ս. Դ. ՄՈՎՍԵՍՅԱՆ, Մ. Գ. ՈՒՐԳԱՆԶՅԱՆ, Ռ. Գ. ԲԱՄԱԼՅԱՆ

ԻՆՍՈՒԼԻՆԻ ԱԶԴԵՅՈՒԹՅՈՒՆԸ ՍԱԴԱԹԹՎԻ ՕՔՍԻԴԱՑՄԱՆ ՎՐԱ՝
ԱՌՆԵՏՆԵՐԻ ՄԵԿՈՒՍԱՅՎԱԾ ՍՏՈՇԱՆՈՒ ԿՈՂՄԻՑ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրվել է ինսուլինի ազդեցությունը սաղաթթվի օքսիդացման պրոցեսի վրա մկանային հյուսվածքում (առնետի մեկուսացված ստոծանի)։ Պարզվել է, որ ինսուլինը (1,1 մ/մլ) զգալի շափերով բարձրացնում է սաղաթթվի օքսիդացման ինտենսիվությունը մկանային հյուսվածքի կողմից։

Ծնթադրվում է, որ ինսուլինի այդ ազդեցությունն իրականանում է դեպի մկանային հյուսվածք սաղաթթվի ներթափանցման արագության փոփոխությամբ։

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Krebs H. A. & Eggleston L. V. Biochem. J., 32, 913, 1938.
2. Shorr E. & Barker S. B. Biochem. J., 33, 1798, 1939.
3. Stare F. J. & Baumann C. A. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 7, 1939.
4. Stadie W. C., Zapp J. A. & Luckens F. D. W. J. Biol. Chem., 132, 411, 1940.
5. Stare E. J. & Baumann C. A. J. Biol. Chem., 133, 453, 1940.
6. Rice L. & Evans E. A. Science, 97, 470, 1943.
7. Ville C. & Hastings A. B. J. Biol. Chem., 181, 131, 1949.
8. Frohman J. S., Orten J. M. & Smith A. H. J. Biol. Chem., 193, 803, 1951.
9. Ochoa S. J. Biol. Chem., 149, 577, 1943.
10. Cori C. F. In: A. Symposium on Respiratory Enzymes, Madison, 175, 1942.
11. Kaplan N. O. & Greenberg D. M. J. Biol. Chem., 156, 525, 1944.
12. Kaplan N. O. & Greenberg D. M. J. Biol. Chem., 156, 553, 1944.
13. Randle P. J. & Smith G. H. Biochem. J., 70, 490, 1958, 70, 490, 1958.
14. Levin R. & Goldstein M. S. Res. Prog. Horm. Res., 11, 343, 1955.
15. Park C. R., Bornstein J. & Post R. L. Am. J. Physiol., 182, 12, 1955.
16. Park C. R. & Johnson L. H. Am. J. Physiol., 182, 17, 1955.
17. Nakada H. J. & Wick A. N. Am. J. Physiol., 185, 23, 1956.
18. Levin R., Goldstein M. S., Huddleston B. & Klein S. P. Am. J. Physiol., 163, 70, 1950.
19. Goldstein M. S., Henry N. L., Huddleston B. & Levin R. Am. J. Physiol., 173, 207, 1953.
20. Krahl M. E. J. Biol. Chem., 200, 99, 1953.
21. Sinex F. M., MacMullen J. & Hastings A. B. J. Biol. Chem., 198, 615, 1952.