

Г. А. ПАНОСЯН, Э. С. ГЕВОРКЯН, Т. С. ДАНИЕЛЯН, К. Б. НАЗАРЯН

ИНДУКЦИЯ ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ГИДРОКОРТИЗОНОМ

Процесс индукции ферментов, хорошо изученный у микробов, наблюдается также у высших организмов, у которых точно установлен факт гормональной и субстратной индукции для многих ферментов [1]. Исследование индукции ферментов у высших организмов представляется чрезвычайно важным для выяснения механизмов внутриклеточной регуляции в дифференцированных тканях, где процессы индукции ферментов и постоянного «отключения» определенной части генома дифференцированной клетки находятся в сложной взаимозависимости. Исследование гормональной индукции ферментов у высших организмов имеет также большое значение для выяснения механизмов действия гормонов и их роли в регуляторных системах организма.

В свете изложенного выявляются некоторые новые стороны нейро-эндокринных взаимоотношений. К хорошо известному влиянию нервной системы на функцию эндокринных органов и действию гормонов на функционирование нервной системы прибавляется мало изученный или вернее вовсе не изученный феномен включения генетического аппарата клеток нервной системы или эффекторных органов в ответ на воздействие различными гормонами.

Гормональная индукция специфичных для нервной системы ферментов должна быть показателем включения генетического аппарата во взаимоотношение нервной и эндокринной систем, рассматриваемого в более широком плане.

Одним из подобных ферментов является холинэстераза, широко распространенная в нервной системе и в эффекторных органах. Однако поиски соответствующей литературы по индукции холинэстеразы у высших организмов были безуспешными. Лишь в некоторых ранних работах [6, 7, 10] было высказано предположение о существовании субстратной (новокаиновой) индукции холинэстеразы, которое было основано на неверном мнении об идентичности холинэстеразы и новокаинэстеразы; в дальнейшем было доказано, что новокаин индуцирует отличный от холинэстеразы фермент новокаинэстеразу [1]. Имеются также косвенные данные о возможной индукции холинэстеразы при различных патологических состояниях. Так, например, при изучении развития экспериментального атеросклероза было показано, что скармливание холестерина приводит к появлению в интима аорты кроликов холинэстеразы, отсутствующей у контрольных животных [5]. Активацию холинэстеразы при введении хо-

лестерина наблюдали также Покровский и Щеплецов [4]. Эти данные указывают на принципиальную возможность индукции холинэстеразы у животных.

В свете сказанного обнаружение феномена гормональной индукции холинэстеразы представляется нам чрезвычайно важным. Поэтому мы задались целью получить указанную индукцию с тем, чтобы в дальнейшем, используя эту модель, иметь возможность исследовать взаимозависимость функционирования генетического аппарата клетки и нейро-эндокринной деятельности организма. Предварительное сообщение опубликовано ранее [3].

Материал и методы исследования. В работе использованы: гидрокортизон фирмы «Рихтер» (ВНР); субстраты ацетилхолинхлорид (химфармзавод им. Карпова, Москва), бутирилтиохолинхлорид (Austrowaren, Вена), ацетил- β -метилхолин (Calbiochem, США); ингибиторы актиномицин Д («Reanal», ВНР) и пурамицин (American Cyanamid Company, США).

Исследования проводили на крысах, мышах, курах и лягушках. Индукцию холинэстеразы вызывали путем подкожного введения гидрокортизона в дозе 5 мг/100 г веса животного. Животных забивали через 3—3,5 часа после введения гидрокортизона. Актиномицин Д (50 мкг/100 г) и пурамицин (17 мг/100 г) вводили подкожно за час до инъекции гидрокортизона. Для определения действия гидрокортизона непосредственно на фермент *in vitro* (активация или ингибирование) гормон в различных концентрациях (5—500 мкг/мл) вводили непосредственно в реакционную среду, содержащую экстракт ткани, субстрат и соответствующую буферную систему.

После декапитации контрольных и опытных животных различные органы (сердце, печень, почки и головной мозг) быстро извлекали и промывали холодным 0,14 М КСl. Ткани гомогенизировали в 0,14 М КСl в течение 5—6 мин при 2—4°C. Полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 6000 об/мин. Холинэстеразную активность определяли по методу Паносяна [2], модифицированному для спектрофотометрического определения. В качестве субстрата использовали ацетилхолин (общая холинэстераза), бутирилтиохолин (ложная холинэстераза) и ацетил- β -метилхолин (истинная холинэстераза). Результаты экспериментов обрабатывали статистически с вычислением среднего квадратичного отклонения и доверительного интервала.

Результаты и обсуждение. На рис. 1 приведены данные опытов по определению общей холинэстеразной активности печени до и после введения гидрокортизона различным животным. Во всех случаях наблюдается увеличение активности. Менее всего это увеличение выражено у лягушки (на 20—25%) и более всего—у мышей (на 70—80%). В некоторых случаях у крыс и мышей наблюдается двукратное и большее увеличение ее.

Индукция общей холинэстеразной активности наблюдается не только в печени, но и в других органах: почке, сердце и головном мозге, приблизительно в одинаковой степени (на 80—100%) (рис. 2). Однако при использовании в качестве субстратов ацетил- β -метилхолина и бутирилтиохолинхлорида обнаруживаются резкие различия в степени индукции: истинная холинэстераза более всего индуцируется в головном мозге (около 80%) и менее всего в сердце (около 15%), тогда как ложная холинэстераза индуцируется более всего в сердце (на 100%) и менее всего в головном мозге (менее 20%).

Увеличение активности фермента еще не говорит об индукции (под индукцией понимается синтез фермента *de novo*), так как оно может быть

результатом изменения конформации фермента, превращения неактивной формы в активную, высвобождения из неактивных комплексов и т. п. Для того чтобы определить, имеем ли мы дело с истинной индукцией или с активированием ферментов, были проведены следующие эксперименты.

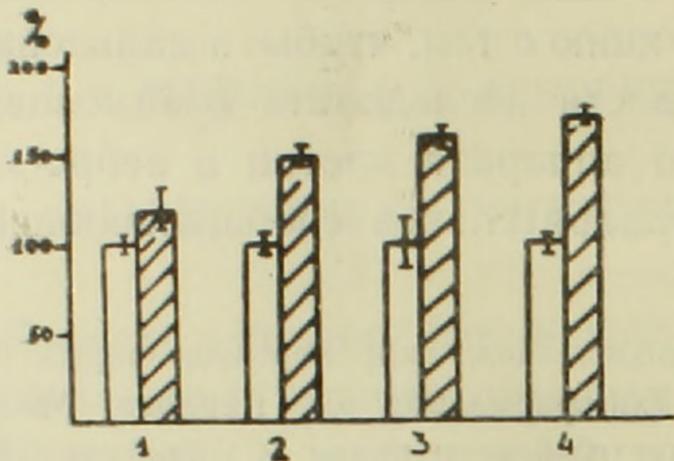


Рис. 1. Холинэстеразная активность печени разных животных после введения гидрокортизона. По оси ординат—активность холинэстеразы в % к контролю. 1—лягушка, 2—кураца, 3—крыса, 4—мышь. Белые столбики—контроль, заштрихованные столбики—после введения гидрокортизона (5 мг/100 г). Субстрат—ацетилхолинхлорид.

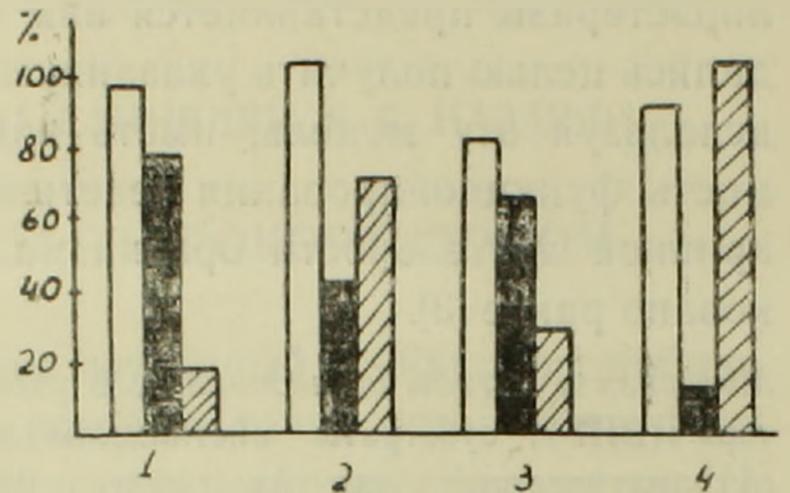


Рис. 2. Индукция гидрокортизоном истинной и ложной холинэстераз в различных органах крысы. По оси ординат—прирост активности холинэстеразы в % к контролю. 1—головной мозг, 2—печень, 3—почка, 4—сердце. Белые столбики—ацетилхолин, черные столбики—ацетил-β-метилхолин, заштрихованные столбики—бутирилтиохолин.

Во-первых, необходимо было выяснить, действует ли гидрокортизон непосредственно на холинэстеразную активность, если он присутствует в реакционной среде.

Для этого гидрокортизон в различных концентрациях (от 5 до 500 мкг/мл) добавляли к экстракту печени как контрольных, так и опытных (т. е. получивших гидрокортизон *in vivo*) групп и в этих условиях определяли скорость расщепления ацетилхолинхлорида.

Результаты этих экспериментов приведены на рис. 3, из которого видно, что низкие концентрации (5 мкг/мл) не действуют на холинэстеразную активность гомогенатов печени контрольных животных, тогда как

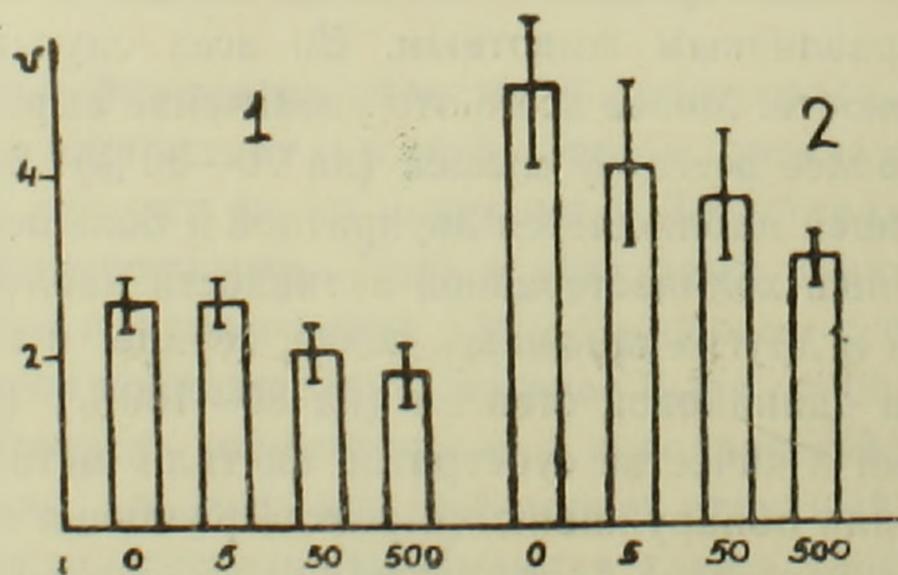


Рис. 3. Действие *in vitro* гидрокортизона на холинэстеразную активность гомогенатов печени контрольных (1) и получивших гидрокортизон (2) крыс. По оси ординат—скорость расщепления ацетилхолина (в мкМ/мин); цифры по оси абсцисс—гидрокортизон, добавленный *in vitro* (в мкг/мл).

та же концентрация подавляет активность холинэстеразы гомогенатов печени крыс опытной группы. Более высокие концентрации, по-видимому, соответствующие концентрации *in vivo*, даже подавляют активность холинэстеразы *in vitro* во всех случаях. Таким образом, гидрокортизон *in vitro* не активизирует, а наоборот, несколько угнетает активность холинэстеразы.

Отсутствие активирующего действия гидрокортизона *in vitro* не указывает на то, что обнаруженное нами увеличение активности холинэстеразы, вызванное подкожным введением гидрокортизона, является результатом индукции холинэстеразы. Увеличение активности может быть результатом «высвобождения» или «биологического активирования» холинэстеразы *in vivo*, не связанного с синтезом фермента *de novo*.

Опыты по определению холинэстеразы в плазме крови и в эритроцитах, результаты которых представлены на рис. 4, показали, что, если в плазме крови активность после введения гидрокортизона увеличивается вдвое через 3,5 часа, то в эритроцитах она остается неизменной, каковой факт указывает на истинную индукцию фермента, вызванную гидрокортизоном, так как эритроциты, лишенные ядер, не могут синтезировать соответствующие информационные РНК *de novo*.

Для определения синтеза фермента *de novo* мы использовали также ингибиторы белкового синтеза—актиномицин Д и пурамицин. Результаты этих экспериментов приведены на рис. 5. Здесь показано, что актиноми-

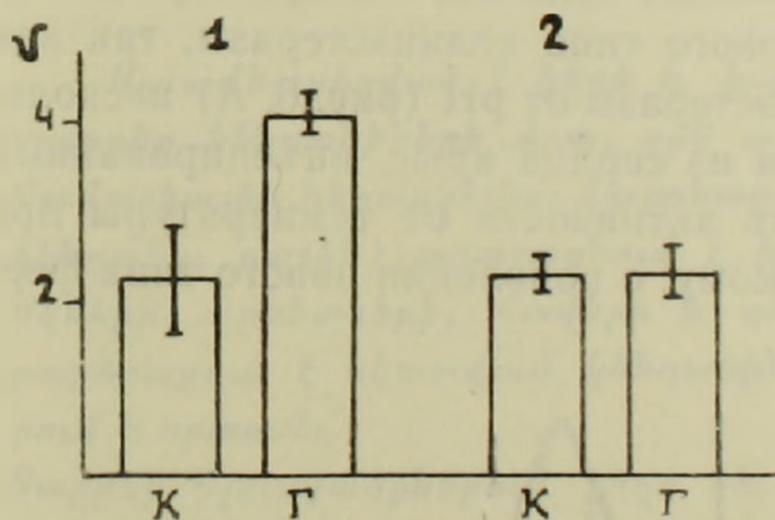


Рис. 4. Холинэстеразная активность плазмы и эритроцитов крови крыс после введения гидрокортизона. По оси ординат—скорость расщепления ацетилхолина (в мкМ/мин). К—контроль, Г—после введения гидрокортизона, 1—плазма, 2—эритроциты.

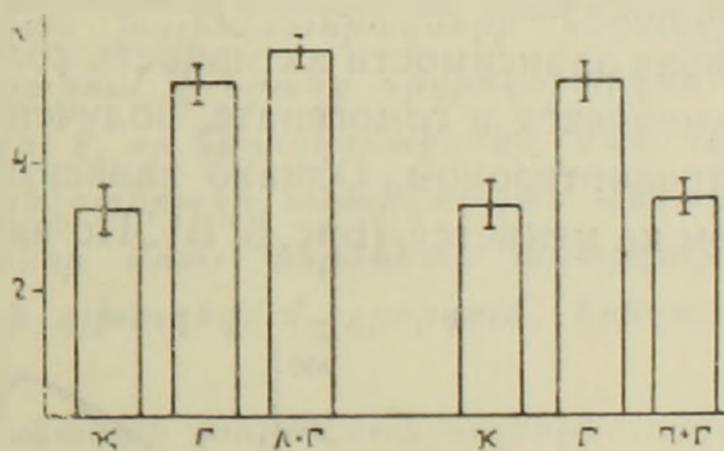


Рис. 5. Действие актиномицина Д и пурамицина на гормональную индукцию холинэстеразы. По оси ординат—скорость расщепления ацетилхолина (в мкМ/мин). К—контроль, Г—после введения гидрокортизона, А+Г—после предварительного введения актиномицина, П+Г—после предварительного введения пурамицина.

цин Д в концентрации 50 мкг/100 г веса животного не только не угнетает, но даже увеличивает активность холинэстеразы, тогда как пурамицин в больших концентрациях (17 мг/100 г) полностью снимает эффект гидрокортизона, не влияя на фоновую активность холинэстеразы. Усиливающий эффект актиномицина Д, на первый взгляд, как будто бы противоречит известному ингибиторному эффекту актиномицина Д на белковый

синтез. Однако необходимо отметить, что в литературе имеется целый ряд данных, указывающих на то, что актиномицин обладает сложным действием на животный организм, зависящим от многих факторов, в том числе от действия на эндокринные органы [9]. По данным Розена и др. [8], концентрации актиномицина Д от 15 до 50 мкг/100 г (т. е. концентрации, использованные в наших опытах) сами приводят к увеличению активности таких индуцибельных ферментов, как триптофанпирролаза, аланинтрансаминаза, тирозинтрансаминаза и сериндегидраза. Таким образом, увеличение активности холинэстеразы при воздействии актиномицином Д *in vivo* не противоречит утверждению об индукции холинэстеразы гидрокортизоном, а наоборот, подтверждает его, так как аналогичный эффект имеется и при индуцируемых эффектах. Следовательно, и отсутствие изменения активности холинэстеразы в эритроцитах при введении гидрокортизона, и стимулирующий эффект актиномицина Д в малых дозах, и полное снятие эффекта гидрокортизона пурамицином говорят о том, что гидрокортизон приводит к индукции холинэстеразы, а не к активированию ее.

При исследовании индукции ферментов у животных очень важно выяснение вопроса, что является причиной индукции: усиление деятельности активных генов или дерепрессия неактивных до того генов, иначе говоря, увеличивает ли гидрокортизон количество имеющегося типа холинэстеразы, или же в клетках появляется новая форма этого фермента? Наши предварительные данные показывают (рис. 6), что при гормональной индукции возможно появление нового типа холинэстеразы, так как кривая зависимости активности холинэстеразы от рН (рис. 6, А) несколько меняется в гомогенате, полученном из сердца крыс, инъецированных гидрокортизоном. Однако зависимость активности от температуры при этом не меняется (рис. 6, В). По-видимому, о появлении нового типа фер-

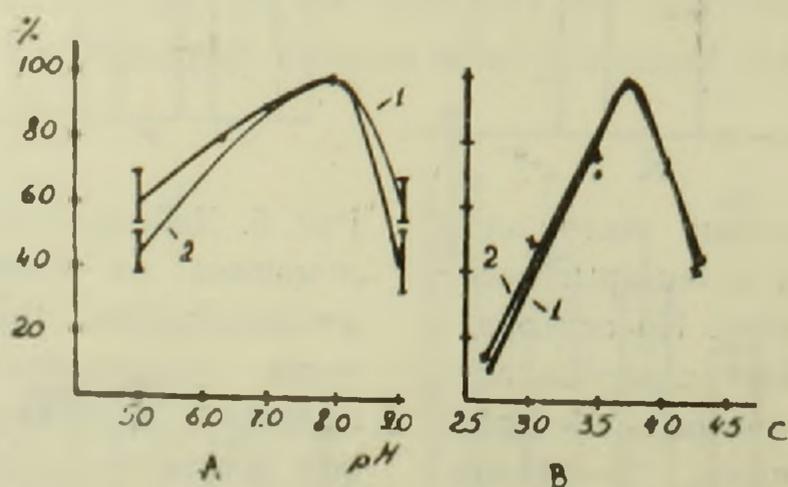


Рис. 6. Зависимость холинэстеразной активности от рН (А) и температуры (В) гомогенатов сердца контрольных крыс (1) и крыс, получивших гидрокортизон (2).

мента говорят и результаты опытов, представленные на рис. 3, в котором наблюдается повышенная чувствительность индуцированного фермента к гидрокортизону. Независимо от того, что лежит в основе индукции холинэстеразы гидрокортизоном, стимулирование активности действующих генов или дерепрессия неактивных, сам факт гормональной индукции хо-

линэстеразы как в нервной системе, так и в эффекторных органах. представляется нам чрезвычайно важным и требующим дальнейшего исследования.

Таким образом, гидрокортизон вызывает увеличение активности холинэстеразы у мышей, крыс, кур и лягушек. Повышение активности наблюдается в головном мозге, печени, почках и сердце. Степень повышения активности истинной и ложной холинэстераз различны в различных органах.

Отсутствие повышения активности холинэстеразы в эритроцитах и действие ингибиторов белкового синтеза актиномицина Д и пуромицина указывает на то, что гидрокортизон индуцирует синтез холинэстеразы de novo.

В статье обсуждается возможность синтеза новой формы холинэстеразы при гормональной индукции.

Институт экспериментальной биологии
АН АрмССР

Поступило 22.IX 1971 г.

Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ, Է. Ս. ԳԵՎՈՐԳՅԱՆ, Տ. Ս. ԴԱՆԵԼՅԱՆ, Կ. Բ. ՆԱԶԱՐՅԱՆ

ԽՈՒՆԷՍՏԵՐԱԶԻ ԻՆԴՈՒԿՑԻԱՆ ՀԻԴՐՈԿՈՐՏԻՉՈՆՈՎ

Ա մ փ ո փ ու մ

Ուսումնասիրված է կեղծ և իսկական խոլինէստերազների ինդուկցիան տարբեր կենդանիների մոտ, որն առաջանում է նրանց հիդրոկորտիզոն ենթամաշկային ներարկելիս: Հայտնաբերվել է, որ հիդրոկորտիզոնն (5մգ, 100 գ կենդանու քաշին) առաջացնում է խոլինէստերազի ակտիվության մեծացում մկների, առնետների, հավերի և գորտերի մոտ: Ֆերմենտի ակտիվության բարձրացում է նկատվում կենդանիների գլխուղեղում, լյարդում, երիկամներում և սրտում:

Տարբեր հյուսվածքներում կեղծ և իսկական խոլինէստերազների ակտիվության բարձրացման աստիճանը տարբեր է:

Արյան էրիտրոցիտներում խոլինէստերազի ակտիվության բարձրացման բացակայությունը և սպիտակուցային սինթեզի ինհիբիտորներ՝ ակտինոմիցինի և պուրոմիցինի ազդեցության ուսումնասիրությունը ցույց են տալիս, որ հիդրոկորտիզոնը ինդուկցիվում է խոլինէստերազի սինթեզը de novo. Քրոնարկվում է հորմոնալ ինդուկցիայի ժամանակ խոլինէստերազի նոր ձևի ի հայտ գալու հնարավորությունը:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Крицман М. Г., Конилова А. С. Индукция ферментов в норме и патологии. «Медицина», М., 1968.
2. Паносян Г. А. Известия АН АрмССР, серия биол., 11, 6, 21, 1958.
3. Паносян Г. А., Геворкян Э. С., Данелян Т. С. Тез. докл. Всес. конф., посв. 70-летию Х. С. Коштоянца. Ереван, АН АрмССР, 1971.

4. Покровский А. А., Щebleцов В. Л. Атеросклероз. Мат-лы конф. Л., 1965.
5. *Lojda Z., Zemplenyi T. J. Atheroscler. Res. 1, 101, 1961.*
6. *Kalov W. J. Pharmacol. 104, 122, 1952.*
7. *Kalov W., Maykut M. O. J. Pharmacol. 116, 418, 1956.*
8. *Rosen F., Raina P. N., Micholand R. J. Science, 146, 661, 1964.*
9. *Schwartz H. S., Sternberg S. S. Philips. In: Actinomycin. Ed. S. A, Waksman, N. Y., p. 101, 1968.*
10. *Terp P. Acta Pharmacol. 9. 374, 1953.*