

Э. С. ГЕВОРКЯН, Ж. В. ЯВРОЯН, Г. А. ПАНОСЯН

## ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ИНДУЦИБЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ СИСТЕМ В ТКАНЯХ КРЫС ПРИ ДЕЙСТВИИ ГИДРОКОРТИЗОНА И ИНСУЛИНА

Изучалось влияние двух гормонов на активность четырех ферментативных систем в головном мозге и сердце крыс. Показано, что гидрокортизон повышает активность холинэстеразы, уменьшает гексокиназную и лактатдегидрогеназную активность, не влияет на активность алкогольдегидрогеназы в обеих тканях. Инсулин вызывает индукцию гексокиназы, подавляет активность холинэстеразы и лактатдегидрогеназы, не оказывает влияния на алкогольдегидрогеназную активность. При совместном действии гормонов выявляется их антагонизм, который, по-видимому, связан с генной регуляцией.

Гормональная регуляция охватывает практически все важнейшие этапы метаболизма путем влияния гормонов на активность ферментов, активность их биосинтеза, причем под гормональным контролем находятся процессы как транскрипции, так и трансляции. Одним из перспективных путей выяснения природы гормональной регуляции является изучение структур клетки, с которыми гормоны могут взаимодействовать, а также выяснение механизмов такого взаимодействия. Иными словами, изучение механизмов гормональных воздействий на генетический аппарат клетки вплотную связано с выявлением механизма действия гормонов, их проницаемости через мембранные структуры, способности образовывать гормон-рецепторные комплексы в цитоплазме, проникать в ядро, взаимодействовать с компонентами хроматина. Примерно такой механизм присущ многим стероидным гормонам — индукторам ферментативных систем, участвующим в метаболизме аминокислот [1—3].

Настоящая работа представляет собой часть исследований по выявлению и выбору гормоно-индуцибельных ферментативных систем в тканях крыс с целью дальнейшего исследования механизмов гормональной индукции у высших организмов, а также изучения характерных особенностей влияния гормонов разной природы на генетический аппарат клетки. Работа посвящена изучению влияния белкового гормона инсулина и кортикостероидного гормона гидрокортизона на активность холинэстеразы (3.1.1.8.), гексокиназы (2.7.1.1.), лактатдегидрогеназы (1.1.1.27) и алкогольдегидрогеназы (1.1.1.1.) в мозговой и сердечной тканях крыс. Гидрокортизон является наиболее изученным индуцирующим кортикостероидным гормоном, механизм действия которого достаточно известен [4—6]. Инсулин, известный как гормон так называемого «общего» воздействия, осуществляющий ряд важнейших физиологических функций в организме, способен также стимулировать

вать синтез некоторых белков-ферментов, действуя на генном уровне [7, 8]. Универсальность инсулина, имеющего широкий диапазон влияния, мешает выявлению точного механизма действия гормона, хотя по этому вопросу в литературе имеется огромное количество данных [9—13]. Исследование влияния гормонов на активность ферментов, имеющих разные функции, локализацию, катализирующих различного рода реакции, позволит более всесторонне подойти к изучению механизма действия гормонов, выбрать индуцибельные системы, удобные для дальнейших исследований.

*Материал и методика.* В работе использовали гидрокортизон фирмы «Рихтер» (ВНР), цинк-инсулин (Минский завод эндокринных препаратов), АТФ, НАД, НАД-восстановленный, актиномицин-Д (все фирмы «Рсанал», ВНР), пурамицин (American Syupamid Company, США).

Исследование проводили на крысах. Гидрокортизон вводили подкожно в количестве 5 мг на 100 г веса животного; животных декапитировали через 3,5—4 часа. Инсулин вводили внутривенно в количестве 1 ед. на 100 г веса крысы; животных декапитировали через 4 часа. Для опытов *in vitro* брались концентрации гормонов в 10 раз ниже и в 10 раз выше концентрации в опытах *in vivo*. Актиномицин-Д и пурамицин вводили в количестве 75 мкг и 15 мг на 100 г животных соответственно, за час до инъекции гормонов. Приготовление гомогената и определение холинэстеразной активности описаны ранее [14]. Активность гексокиназы, лактатдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы определяли спектрофотометрически [15].

Результаты экспериментов обработаны статистически.

*Результаты и обсуждение.* В таблице приведены результаты экспериментов по изучению влияния гидрокортизона и инсулина на все четыре ферментативные системы в мозговой и сердечной тканях крыс. Из

Т а б л и ц а

Действие инсулина и гидрокортизона на холинэстеразную, гексокиназную, лактатдегидрогеназную и алкогольдегидрогеназную активность в мозге и сердце крыс

Гормоны	Контроль		Инсулин		Гидрокортизон	
	т к л и н					
	м зг	сердце	мозг	сердце	мозг	сердце
Холинэстераза	2,46±0,072	2,56±0,08	2,23±0,09	2,38±0,14	4,14±0,11	4,84±0,09
Гексокиназа	27,26±1,12	7,27±1,38	31,37±1,67	42,38±3,84	25,85±1,93	21,81±0,16
Лактатдегидрогеназа	13,31±0,34	8,10±0,44	12,76±0,50	7,42±0,47	12,08±0,53	7,08±0,57
Алкогольдегидрогеназа	3,01±0,18	5,14±0,19	3,01±0,22	5,00±0,25	3,52±0,32	4,86±0,27

этих данных явствует, что гормоны оказали неодинаковое действие на активность указанных ферментов. Так, гидрокортизон увеличивает холинэстеразную активность в обеих тканях в среднем на 70—80%, что было показано нами и в ранних экспериментах [14], в то время как активность гексокиназы под действием гормона уменьшается (на 5—6% в мозге, на 39—40% в сердце). Уменьшение активности гексокиназы и

других ферментов глюконеогенеза под действием гидрокортизона хорошо известно в литературе, хотя это явление разными авторами интерпретируется по-разному [16, 17]. Лактатдегидрогеназная активность также подавляется под влиянием гидрокортизона (в сердце на 18—20%). Изменение активности лактатдегидрогеназы в мозге под действием гидрокортизона незначительно.

В настоящее время четко установлена регулируемость этого фермента в различных тканях, хотя результаты опытов довольно разноречивые. Выявление изоферментного спектра лактатдегидрогеназы при гормональных воздействиях показало, что гидрокортизон в ряде органов подавляет в основном изоферменты М-типа, а на содержание изоферментов Н-типа не влияет, и в результате общая активность фермента уменьшается незначительно или почти не меняется [18]. В литературе имеются также данные о том, что различные патологические состояния, связанные с гипоксией (хроническая гипоксия, острая ишемия конечностей, инфаркт миокарда и др.), приводят к изменению активности изоферментов М-типа лишь в тех тканях, в которых их активность невелика [19]. Выявленный нами факт подавления активности лактатдегидрогеназы сердца крыс при действии гидрокортизона хорошо согласуется с этими результатами. Активность алкогольдегидрогеназы в обеих тканях под действием гидрокортизона, а также инсулина достоверно не меняется (табл.). Инсулин вызывает лишь некоторое уменьшение холинэстеразной активности в обеих тканях, причем в головном мозге активность фермента подавляется на 14, а в сердечной мышце—на 9%. В литературе нам не удалось найти сведений о регулировании активности холинэстеразы инсулином. Известно, что этот гормон в некоторых случаях способен выступать в качестве модификатора ферментных молекул, непосредственно влияя на четвертичную структуру белков-ферментов и тем самым вызывая изменения ферментативной активности [17]. Уменьшение активности холинэстеразы под действием инсулина может быть результатом именно такого воздействия гормона, однако это предположение, несомненно, требует дополнительного экспериментального подтверждения. Результаты, приведенные на таблице, показывают, что инсулин почти не влияет на активность лактатдегидрогеназы, хотя в обеих тканях наблюдается незначительное уменьшение активности фермента при введении гормона. Вместе с тем он вызывает значительное увеличение активности гексокиназы (в сердце на 54, в мозге на 16%). Полученные результаты в основном подтверждаются имеющимися в литературе данными о стимуляции гексокиназной активности инсулином в ряде органов (в почках, печени, жировой ткани, сердечной мышце, скелетной мышце и др.) [20]. Все эти ткани, по-видимому, являются мишенями для инсулина. Установлено также, что он индуцирует некоторые ключевые ферменты гликолиза и что при этом усиливается синтез всех типов РНК [21, 22].

Обобщая результаты данной серии экспериментов, можно заключить, что в обеих тканях крыс наблюдается стимулирование активности

холинэстеразы гидрокортизоном и гексокиназы инсулином. Оба гормона вызывают некоторое подавление активности лактатдегидрогеназы, а на активность алкогольдегидрогеназы не оказывают существенного влияния.

Вторая серия экспериментов была поставлена с целью выявления истинной индукции ферментов (гексокиназы и холинэстеразы) под действием гормонов. На рис. 1 представлены результаты экспериментов по изучению влияния ингибиторов синтеза белка актиномицина-Д и пуру-

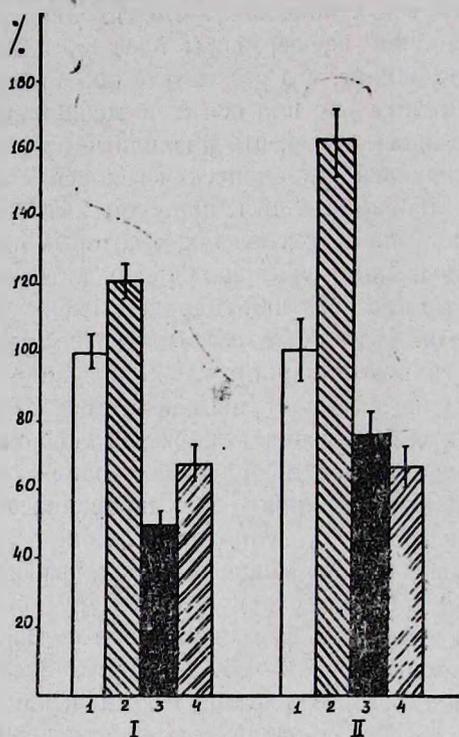


Рис. 1. Действие ингибиторов синтеза белка на повышение инсулином гексокиназной активности в мозге (I) и в сердце (II) крыс. На оси ординат—активность гексокиназы в процентах: 1—контроль, 2—обработка инсулином, 3—актиномицин-Д+инсулин, 4—пурумицин+инсулин.

мицина на увеличение активности гексокиназы в обеих тканях при введении инсулина. Результаты показывают, что оба ингибитора белкового синтеза полностью угнетают повышение активности фермента под действием гормона в обеих тканях, что свидетельствует об истинной индукции фермента гормоном; при этом, видимо, инсулин действует как на транскрипционном, так и на трансляционном уровне синтеза белка-фермента. Эти результаты хорошо согласуются с имеющимися в литературе данными [7, 8, 23]. Нашими ранними экспериментами была доказана индукция холинэстеразы гидрокортизоном [14].

На рис. 2 представлены результаты опытов по влиянию инсулина и

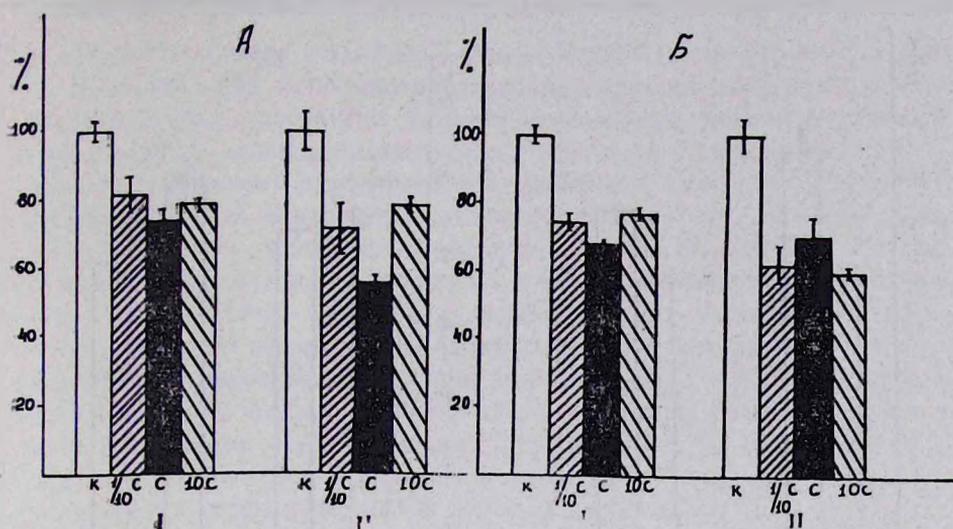


Рис. 2. Действие гидрокортизона (А) и инсулина (Б) на активность лактатдегидрогеназы *in vitro* в гомогенате мозга (I) и сердца (II) крыс. На оси ординат—активность лактатдегидрогеназы в процентах; К—контроль, С—концентрация гормонов, соответствующая концентрации их в экспериментах *in vivo*.

гидрокортизона на активность лактатдегидрогеназы в экспериментах *in vitro*. Опыты показали, что снижение активности фермента под действием гормонов наблюдается также в экспериментах *in vitro*, причем максимальное угнетение активности обнаружено при концентрации гормонов, приблизительно равной их концентрации в опытах *in vivo*. Эти результаты свидетельствуют о том, что наблюдаемое в экспериментах *in vivo* угнетение активности лактатдегидрогеназы под действием гормонов, по-видимому, обусловлено непосредственным влиянием гормонов на фермент или же на факторы, приводящие к некоторому ингибированию активности фермента в обеих тканях.

На рис. 3 приводятся результаты экспериментов по изучению совместного действия двух гормонов на активность холинэстеразы в обеих тканях крыс. Выяснилось, что активность холинэстеразы в обеих тканях повышается по сравнению с контролем на 40% в мозге и на 20% в сердце. Учитывая тот факт, что гидрокортизон индуцирует холинэстеразу в обеих тканях примерно на 80—90% [14], а инсулин при раздельном введении несколько снижает активность фермента (табл.), уменьшение уровня индукции можно объяснить антагонизмом в механизме действия двух гормонов. В литературе накопилось много данных, свидетельствующих о так называемом «антагонизме» в механизме действия гидрокортизона и инсулина при гормональной индукции некоторых ферментов [24, 25]. Такой антагонизм, согласно Мертвецову [24], может реализовываться на разных уровнях регуляции активности ферментов: он может быть результатом торможения одним из данных гормонов тех ферментативных систем, которые индуцируют другой гормон, или же интенсивная транскрипция одного участка генома может препятствовать транскрип-

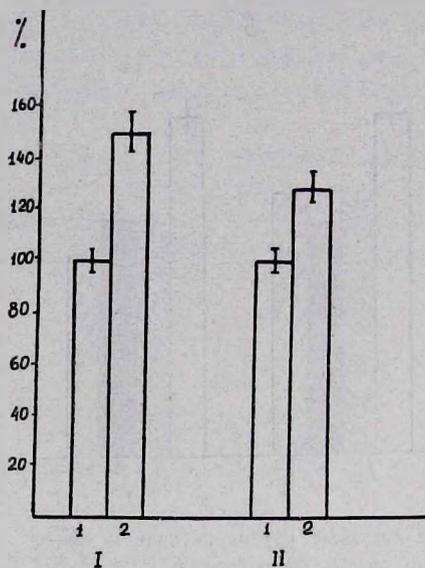


Рис. 3.

Рис. 3. Совместное действие гидрокортизона и инсулина на активность холинэстеразы в мозге (I) и сердце (II) крыс. На оси ординат — активность фермента в процентах; 1—контрольный опыт, 2—опыт с инсулином и гидрокортизоном.

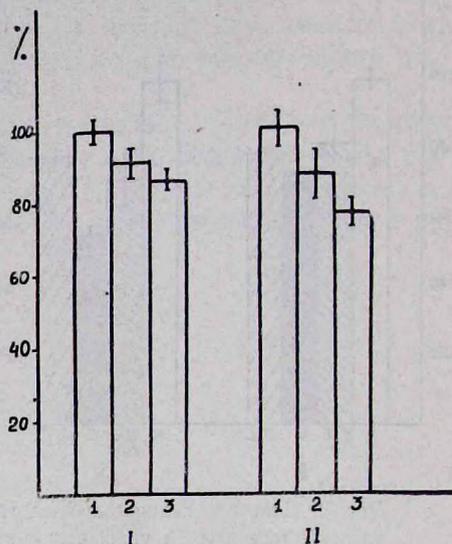


Рис. 4.

Рис. 4. Совместное действие гидрокортизона и инсулина на активность лактатдегидрогеназы в мозге (I) и сердце (II) крыс. На оси ординат—активность фермента в процентах; 1—контрольный опыт, 2—опыт с гидрокортизоном, 3—опыт с гидрокортизоном и инсулином

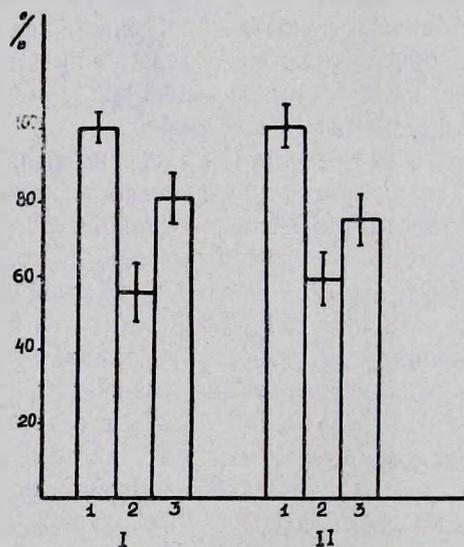


Рис. 5. Совместное действие гидрокортизона и инсулина на активность гексокиназы в мозге (I) и сердце (II) крыс. На оси ординат—активность фермента в процентах; 1—контроль, 2—гидрокортизон, 3—гидрокортизон + инсулин.

ции другого участка в этой же клетке. Ясно, однако, что этим возмозности объяснения феномена антагонизма гормонов не ограничиваются. Механизм этого безусловно интересного явления довольно сложный и требует детального и всестороннего исследования. Как показано на рис. 3, инсулин уменьшает активность холинэстеразы, которая индуцируется гидрокортизоном, и в результате получается эффект, который можно представить как «алгебраическую сумму» обоих воздействий. На рис. 4 суммированы результаты опытов по совместному действию гормонов на активность лактатдегидрогеназы в обеих тканях. Опыты показывают, что гормоны при совместном введении вызывают большее угнетение ферментативной активности, чем при введении в отдельности. Отсутствие антагонизма в действии гидрокортизона и инсулина в данном случае является еще одним подтверждением того, что оба гормона снижают активность фермента, ингибируя его непосредственно или же опосредованно, и что этот эффект не связан с генной регуляцией.

Антагонизм двух гормонов был продемонстрирован в экспериментах по изучению совместного действия гидрокортизона и инсулина на активность гексокиназы (рис. 5). Было установлено, что на фоне действия гидрокортизона уровень инсулиновой индукции гексокиназы значительно ниже в обеих тканях. Данный феномен, по-видимому, можно интерпретировать как результат того, что увеличение транскрипции одного участка генома (чувствительного к гидрокортизону) может препятствовать активированию другого участка (чувствительного к инсулину) в геноме этой же клетки. Однако ясно, что выяснение механизма этого сложного явления — антагонизма гормонов — связано с дальнейшим исследованием механизмов гормональной индукции, с изучением действия гормонов на генетический аппарат клетки.

Таким образом, эксперименты показывают, что инсулиновая индукция гексокиназы сердца крыс, наряду с гидрокортизоновой индукцией холинэстеразы, является удобной моделью для дальнейшего исследования механизмов гормональной индукции у высших организмов. Существование антагонизма в механизме действия двух гормонов может способствовать выявлению истинных механизмов гормональной индукции.

Ереванский государственный университет,  
кафедра биофизики

Получено 15.II 1977 г.

Է. Ս. ԴԵՎՈՐՅԱՆ, Ժ. Վ. ՅԱՎՐՈՅԱՆ, Գ. Հ. ՓԱՆՈՍՅԱՆ

ՄԻ ՇԱՐՔ ԻՆՎՈՒԿՑՎՈՂ ՖԵՐՄԵՆՏԱՏԻՎ ՀԱՄԱԿԱՐԳԵՐԻ  
ՈՒՍՈՒՄՆԱՍԻՐՈՒԹՅՈՒՆԸ ԱՌՆԵՏԻ ՀՅՈՒՍՎԱԾՔՆԵՐՈՒՄ  
ՀԻՎՐՈՎՈՐՏԻՉՈՆԻ ԵՎ ԻՆՍՈՒԼԻՆԻ ԱԶԴԵՑՈՒԹՅԱՆ ՆԵՐՔՈՒՄ

Ա մ փ ո փ ո լ մ

Ուսումնասիրվել է երկու հորմոնների ազդեցությունը առանձին գլխուղեղի և սրտի շրջաֆերմենտատիվ համակարգերի վրա: Պարզվել է, որ հիդրոկորտիզոնը խթանում է խոլինէսթերազի ակտիվությունը, իջեցնում հեկսոկինազի և

լակտատդեհիդրոգենազի ակտիվութունը և չի ազդում ալկոհոլդեհիդրոգենազի ակտիվության վրա՝ երկու հյուսվածքներում էլ: Ինսուլինն առաջացնում է հեկսոկինազի ինդուկցիա, իջեցնում է խոլինէսթերազի և լակտատդեհիդրոգենազի ակտիվութունը և չի ազդում ալկոհոլդեհիդրոգենազի ակտիվության վրա: Հորմոնները համատեղ ազդեցության դեպքում ի հայտ է գալիս նրանց անտագոնիզմը, որն անմիջականորեն կապված է գեների կարգավորման հետ:

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Kenney F. T. J. Biol. Chem. 237, 1610, 1962.
2. Cho Y. S., Pitot H. C., Morris H. P. Cancer Res. 24, 52, 1964.
3. Thompson E. B., Tomkins G. M., Curran J. F. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 53 296, 1966.
4. Юдаев Н. А., Протасова Т. Н. Успехи совр. биологии, вып. 1 (4), 128, 1971.
5. Sekerts C. E. Biochem. J. 124, 5, 43p, 1971.
6. Amaral L., Lin K., Samuels A. J., Werthamer S. Blochim. Biophys. Acta, 362, 332, 1974.
7. Labrie E., Korner A. J. Biol. Chem. 243, 1120, 1968.
8. Staib R., Thlenhaus R., Ammedick U., Staib W. Europ. J. Blochem., 8, 23, 1969.
9. Turkington R. W. J. Biol. Chem., 244, 5140, 1969.
10. Schwartz A. G., Amos H. Nature, 219, 1366, 1968.
11. Morgan C. R., Bonner J. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 65, 1077, 1970.
12. Lardy H. A., Foster D. O., Young J. W., Shrago E., Ray P. D. J. cell. compar. physiol., 66, suppl. 1, 2:39, 54, 1966.
13. Старосельцева Л. К. Жур. Всес. хим. о-ва им. Менделеева, 18, 2, 173, 1973.
14. Քանոսյն Գ. Ա., Գեւորկյն Յ. Տ., Դանիելյն Թ. Տ., Նազարյն Կ. Բ. Биологический журнал Армении, 25, 2, 40, 1972.
15. Кочетов Г. А. Практическое руководство по энзимологии, М., 1971.
16. Полянська Л. Б. Фізіол. журн., 16, 5, 609, 1970.
17. Титова Г. В. Биохимия, 39, 2, 418, 1974.
18. Ципко Л. И., Усатенко М. С. Биохимия, 38, 1, 156, 1973.
19. Маркелов И. М. II Всесоюз. биохим. съезд. тез. секц. сообщ., 9-я секция, 27, Ташкент, 1969.
20. Гордиенко О. Е. Изв. Сиб. отд. АН СССР, 5, 1, 126, 1974.
21. Мертвцов Н. П., Сапрыкин В. А., Аргутинская С. В., Салганик Р. И. Пробл. эндокринологии, 17, 5, 78, 1971.
22. Гордиенко О. Е., Чесноков В. Н., Мертвцов Н. П., Салганик Р. И. Пробл. эндокринологии, 19, 4, 78, 1973.
23. Gelehrter Th. D., Tomkins G. M. Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 66, 390, 1970.
24. Мертвцов Н. П. Биохимия, 34, 381, 1969.
25. Ильин В. С., Поликарпова Л. Н. Вопр. мед. химии, 13, 3, 278, 1967.