

# PARTICIPATION OF THYROID HORMONES IN THE PROCESS OF ACTIVITY REGULATION OF GLUTAMINASE OF RAT SPLEEN MITOCHONDRIAL FRACTION

V. S. HOVHANNISIAN, H. L. HAIRAPETIAN

Thyroid hormones have been ascertained to be effective activators of rat spleen mitochondrial fraction glutaminase. The obtained data show that the regulatory properties of spleen glutaminase differ from those of brain, kidney and liver glutaminase.

## Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Бадалян Л. Л., Бунятян Г. Х., Оганесян В. С. Вопросы биохимии мозга, 10, 40, Ереван, 1975.
2. Козлов Е. А., Коваленко Н. А. Успехи биологич. химии, 13, 49, 1972.
3. Оганесян В. С., Амбарцумян В. Г. Биолог. ж. Армении, 32, 5, 477, 1979.
4. Оганесян В. С., Бадалян Л. Л., Микиртумова К. С., Саакян Ж. Дж. Вопросы биохимии мозга, 8, 77, Ереван, 1973.
5. Оганесян В. С., Бунятян Г. Х., Микиртумова К. С., Бадалян Л. Л. Вопросы биохимии мозга, 6, 5, Ереван, 1970.
6. Оганесян В. С., Микиртумова К. С., Бунятян Г. Х. Вопросы биохимии мозга, 12, 5, Ереван, 1977.
7. Оганесян В. С., Саакян Ж. Дж., Айрапетян Р. Л., Бунятян Г. Х. Биолог. ж. Армении, 33, 932, 1980.
8. Оганесян В. С. ДАН АрмССР, 48, 171, 1969.
9. Саакян Ж. Дж., Оганесян В. С. Биолог. ж. Армении, 35, 4, 264, 1982.
10. Силякова А. И., Труш Г. П., Являкова А. Вопросы мед. химии, 8, 538, 1962.
11. Blumson N. L. Biochem. J., 65, 138, 1957.
12. Katunuma N., Hurino A. and Tomino J. Adv. in Enzyme Reg., 5, 55, 1967.
13. Katunuma N., Tomino J., Nishino H. Biochem. and Biophys. Res. Comm., 22, 321, 1966.
14. Katunuma N., Katsunuma T., Tomino J. and Matsuda J. Adv. Enzyme Reg., 6, 227, 1967.
15. Krebs H. A. Biochem. J., 29, 1951, 1937.
16. Kvamme E., Torgner J. Biochem. J., 3, 525, 1974.
17. Kvamme E., Torgner J. FEBS Letters, 2, 47, 1974.
18. Kvamme E., Torgner J. Biochem. J., 83, 194, 1975.
19. Kvamme E., Tveit Band Svanneby G. Biol. Chem., 245, 1871, 1970.
20. Well-Malherb H., Beall G. J. Neurochem., 17, 1101, 1970.
21. Well-Malherb H. J. Neurochem., 19, 1972.

«Биолог. ж. Армении», т. XXXVI, № 1, 1983

УДК 612.45.578.087.9

## ФЛУОРОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОРТИКОСТЕРОНА И КОРТИЗОЛА В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

П. С. СИМАВОРЯН, Э. А. ШИРИНЯН, М. В. ОВСЕПЯН

Предложен новый метод флуорометрического дифференцированного определения кортикостерона и кортизола в присутствии флуорогенных веществ в биологическом ма-

териале. Метод основан на разнице в приросте во времени интенсивности флуоресценции кортикостерона и кортизола. Дифференциация кортикостероидов осуществляется путем 4-разового измерения флуоресценции одной и той же пробы.

*Ключевые слова:* кортикостерон, кортизол, флуоресцентный метод.

Методам выявления содержания кортикостероидов посвящены многочисленные работы [1—3, 5]. Для определения и дифференциации 11-оксикортикостероидов флуорометрический метод следует считать относительно новым, достаточно распространенным и перспективным, так как он сравнительно прост и специфичен. Однако точное определение какого-либо адреналкортикоида, а тем более дифференцированное выявление кортикостерона и кортизола при использовании этого метода, несмотря на известные достоинства его, сопряжены с некоторыми трудностями. Во-первых, оба стероида при флуорометрии имеют одинаковые спектры возбуждения и флуоресценции, то-есть в качественном отношении похожи друг на друга. Во-вторых, измерения экстрактов проводятся в присутствии флуорогенных загрязнителей (как специфических кортикоидных компонентов, так и неспецифических). Подобные флуорогенные помехи трудно учесть даже при применяемых некоторыми авторами [4] дополнительных очистках проб, так как в описанных до настоящего времени способах для введения поправок на флуорогенные загрязнители биологический материал заменяется соответствующими количествами воды или стандартного раствора известной концентрации, которые обрабатываются, как и образец.

В данной работе разрабатывается простая и более специфическая методика дифференцированного определения концентрации кортикостерона и кортизола в биологическом материале, лишенная перечисленных недостатков.

*Материал и методика.* Приводимая методика основывается на классической работе Свит [8], в которой показано, что некоторые кортикостероиды интенсивно флуоресцируют в присутствии серной кислоты. Обработка биологического материала, способы экстракции и выделения кортикостероидов основаны на описанных ранее принципах [1, 6, 7]. В дополнение для дифференцированного определения кортикостерона и кортизола и учета флуорогенных помех нами применен новый способ расчета, основанный на разнице в приросте во времени интенсивности флуоресценции кортикостерона, кортизола и других флуоресцирующих компонентов, что достигается путем 4-разового измерения одной и той же пробы с определенным интервалом. Реактивы и оборудование: хлористый метилен (дихлорметан), дважды перегнанный; этиловый спирт, абсолютный и 33%-ный; концентрированная серная кислота, химически чистая, выдерживающая пробу Савая; петролейный эфир, перегнанный; едкий натр, 0,1 н; кислотно-винный спирт (к 3,5 объемам холодного абсолютного этанола медленно с постоянным размешиванием добавляется 6,5 объемов холодной концентрированной серной кислоты. Смесь готовится в ледяной бане). Стандартные растворы кортикостерона и кортизола в концентрации 200 мкг/мл (приготавливаются на абсолютном этаноле и хранятся в холодильнике, а перед употреблением готовят рабочие растворы); грушевидные колбы или трубки с притертыми пробками объемом 50 мл. Флуоресцентные измерения проводятся на спектрофлуорометре фирмы «Hitachi МРК-4», снабженном ксеноновой лампой. Количественное определение кортикостероида проводится при температуре окружающей среды 18—22°.

К 2 мл гепаринизированной плазмы или сыворотки добавляют 6 мл петролейного эфира. Смесь тщательно встряхивают в течение 30 сек и через 3 мин после разделения фаз отбирают 1 мл плазмы и, прибавляя воду, доводят объем до 2 мл. При опре-

деления содержания кортикостероидов в надпочечниках железы быстро извлекают, взвешивают и гомогенизируют (или растирают в ступке) на холоде в присутствии 33%-ного этанола из расчета 1 мл спирта на 30—50 мг надпочечниковой ткани. Объем проб доводят бидистиллированной водой до 5 мл и отбирают 2 мл для дальнейших исследований. В последующем все процедуры в надпочечниках, крови и моче общие. По 2 мл проб крови, мочи, гомогената надпочечников, рабочего стандартного раствора помещают в 30—50 мл стеклянные грушевидные сосуды или в широкие пробирки с притертой пробкой и добавляют по 15 мл дихлорметана. После тщательного встряхивания в течение 30 сек фазам дают разделиться и затем удаляют и выбрасывают водный (верхний) слой. К 12 мл экстрактов добавляют 2 мл 0,1 N NaOH, перемешивают 15 сек, после разделения фаз удаляют и выбрасывают щелочной (верхний) слой. Засекая время, добавляют 10 мл промытых экстрактов дихлорметана к 5 мл кислотно-винного спирта и встряхивают в течение 1 мин. После разделения фаз немедленно удаляют дихлорметановый (верхний) слой и выбрасывают. Кислотно-винную фазу переносят в квадратные кварцевые кюветы флуориметра в четырежды (точно на 5-й, 15-й, 50-й и 60-й минутах от нулевого времени) измеряют интенсивность флуоресценции при 520 мк, возбуждая пробы светом в 470 мк. Измерение проводят при комнатной температуре в том же временном интервале и последовательности образцов, которые были использованы при добавлении к пробам кислотно-винного спирта.

*Результаты и обсуждение.* При расчете содержания кортикостерона и кортизола в исследуемом материале сначала вычисляют разность показаний проб и стандартных растворов, полученных на 15-й и 5-й мин, а также на 60-й и 50-й мин. Исходя из соответствующих показаний стандартных растворов, вычисляется величина (нг/проба) прироста флуоресценции в 1-м делении на данные отрезки времени (от 5 до 15-й мин и 50 до 60-й мин) и рассчитывается содержание кортизола и кортикостерона (мкг/г свежей ткани или на 100 мл мочи или плазмы), с использованием для надпочечников или биологических жидкостей уравнений:

$$M_1 (15-5) = P_1 KС + P_3 KЛ$$

$$M_2 (60-50) = P_2 KС + P_4 KЛ,$$

где  $M_1 (15-5)$  и  $M_2 (60-50)$  показания прибора, указывающие на прирост флуоресценции в пробе за соответствующий отрезок времени. КС и КЛ—искомое содержание кортикостерона (КС) или кортизола (КЛ) в нг на всю пробу. После нахождения содержания глюкокортикоида в нг на всю пробу легко пересчитать его концентрацию в мкг на грамм или мкг/%. Для примера приводится принцип вычисления концентрации кортикостерона или кортизола в надпочечниках с использованием следующей формулы:

$$КС (КЛ) \text{ в мкг/г} = \frac{КС (КЛ) \text{ в нг/проба} \times 2,5 \times 1,5}{\text{вес ткани в мг}} \times \frac{1000}{1000},$$

где 2,5—частное от  $\frac{5 \text{ (общий объем экстракта надпочечников)}}{2 \text{ (общий объем экстракта надпочечников, взятого в анализ)}}$

1,5—частное от  $\frac{15 \text{ (общий объем дихлорметана)}}{10 \text{ (объем дихлорметана, взятого в анализ)}}$

1000 в числителе—переход от мг к граммам, а 1000 в знаменателе—от мг к мкг.

Выход стандартных растворов кортикостерона и кортизола, пропущенных через все этапы их выделения и определения, составил 92—101% со средней величиной  $96,3 \pm 5,3\%$ . Выявлена линейная зависимость между количествами добавленных стероидов к пробам плазмы крыс и мочи людей (в концентрациях 20—300% от их содержания в пробах) и изменениями их флуоресценции в экстрактах (рис.).

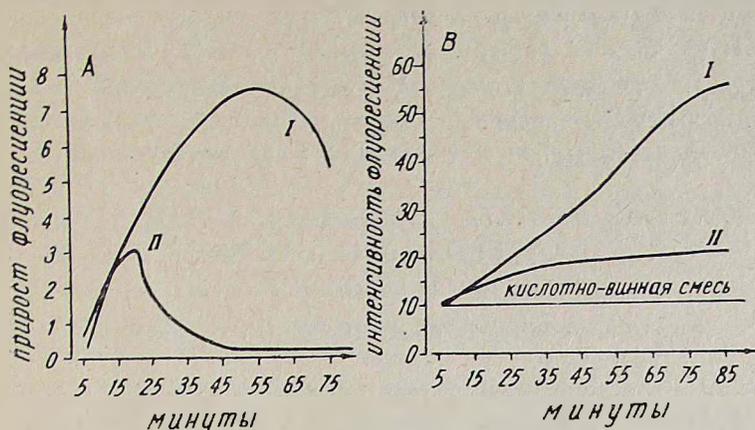


Рис. Прирост флуоресценции изученных кортикостероидов (А) и развитие во времени интенсивности их флуоресценции (В). I—кортикостерон, II—кортизол.

На рис. приведен прирост флуоресценции изученных кортикостероидов (А) и развитие во времени интенсивности их флуоресценции в первые 90 мин. Как видно, флуоресценция стандартного раствора кортикостерона прогрессивно увеличивается в первые 50—60 мин, в дальнейшем прирост его за каждый 10-минутный интервал замедляется. Максимум прироста флуоресценции кортизола наблюдается на 20-й мин, а уже к 45-й мин прироста не отмечается. Экстракционный контроль не дал существенного прироста флуоресценции во все исследованные сроки.

Таким образом, примененное нами 4-х разовое измерение одной и той же пробы на 5—15-й и 50—60-й минутах позволяет вычислить отдельно содержание как кортизола, так и кортикостерона в их смеси, а также учитывать (отсекать) все флуорогенные помехи (как специфические, так и неспецифические).

Полученное предлагаемым методом содержание кортикостерона и кортизола для плазмы людей составило соответственно  $62,5 \pm 0,2$  и  $187 \pm 0,4$  мкг%, кроликов— $2,2 \pm 0,4$  и  $5,5 \pm 0,2$  мкг%.

В надпочечниках и плазме крыс обнаружен лишь кортикостерон в концентрациях  $30 \pm 1,2$  мкг/г и  $11,7 \pm 0,7$  мкг% соответственно.

ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐՈՒՄ ԿՈՐՏԻԿՈՍՏԵՐՈՆԻ ԵՎ ԿՈՐՏԻԶՈՒԻ  
ՏԱՐԲԵՐԱԿԻԶ ՈՐՈՇՄԱՆ ՖՐՈՒՈՐՈՄԵՏՐԻԿ ԵՂԱՆԱԿ

Պ. Ս. ՍԻՄԱՎՈՐՅԱՆ, Է. Ա. ՇԻՐԻՆՅԱՆ, Մ. Վ. ՀՈՎՍԵՓՅԱՆ

Առաջարկված է կորտիկոստերոնի և կորտիզոլի տարբերակիչ որոշման ֆլուորոմետրիկ նոր եղանակ՝ կենսաբանական նյութերում այլ ֆլուորոֆոր քորթոնների առկայության պայմաններում:

Եղանակի հիմքում ընկած է ժամանակի որոշակի հատվածում կորտիկոստերոնի և կորտիզոլի ֆլուորիսցենցիայի ինտենսիվացման աճի տարբերությունը: Կորտիկոստերոիդների տարբերակումն իրականացվում է նույն նմուշի ֆլուորիսցենցիայի քառակի չափման ճանապարհով:

FLUOROMETRIC METHOD OF DIFFERENTIAL DETERMINATION  
OF CORTICOSTERONE AND HYDROCORTISONE  
IN BIOLOGICAL MATERIALS,

P. S. SIMAVORIAN, E. A. SHIRINIAN, M. V. HOVSEPIAN

The result of investigations has been the suggestion of a new method of differential fluorometric determination of corticosterone and hydrocortisone in the presence of fluorogenic agents existing in biological materials. The method is based on the difference of increase of corticosterone and hydrocortisone fluorescence intensity in a certain period of time. The differentiation of corticosteroids has been carried on by 4-fold measurements of fluorescence of one and the same sample.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Меньшиков В. В.* Методы клинической биохимии гормонов и медиаторов. М., 1973.
2. *Юденфренд С.* Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. М., 1965.
3. *Фушио Акасу, Тидори Тэнуя.* Санка то фудзника, 38, 4, 517, 1971.
4. *Butte Y. C., Kakihana, Noble E.* "Steroids", 32, 5, 607, 1978.
5. *De Moore, Steeno O., Raskin M., Hendrikx A.* Acta Endocrinol., 33, 297, 1970.
6. *Mejer L., Blanchard R.* Clin. Chem, 19, 7, 718, 1973.
7. *Silber R., Busch R., Sslapos R.* Clin. Chem, 4, 278, 1958.
8. *Sweat M. J.* Am. Chem. Soc., 73, 4056, 1951.

«Бис.лог. ж. Армении», т. XXXVI, № 1, 1983

УДК 612.821.6+616.826

ВЛИЯНИЕ РАЗРУШЕНИЯ КРАСНОГО ЯДРА НА ЛАБИРИНТНОЕ  
ПОВЕДЕНИЕ КРЫС ПРИ ПИТЬЕВОМ ПОДКРЕПЛЕНИИ

И. Р. МАДАТОВА, О. А. БОЯХЧЯН, С. Г. СААКЯН, М. Х. МИКАЕЛЯН

Изучены нарушения лабиринтного поведения крыс при разрушении красного ядра; проведено сравнение полученных данных с данными о влиянии разрушения зубчатого