

4. Тикуннов Б. А., Каифаджян М. А., Оганесян С. С. Косм. биол., 5, 60—64, 1985.
5. Boström B., Ljung S., Mordth S., et al. Nature, 292, 777—778, 1981.
6. Kothari M., Baner B., Krause H., Fleckenstein A. Pflug. Arch. Gen. Physiol., 335, 309—321, 1972.
7. Kentish J. C., Nayler W. J. Physiol., 284, 90, 1978.
8. Mc. Cluskey F. W., Fox A. P., Feldman D., Tslen R. W. J. Expt. Biol., 124, 177—190, 1986.
9. Nayler W., Pool—Wilson Ph. Basic Res. Cardiol., 76, 1—15, 1981.
10. Pash H. T., England P. J., Prys Roberts C. J. Mol. Cell. Cardiol., 293, 13, 301, 1981.
11. Potter J., Gergely J. J. Biol. Chem., 250, 4628—4633, 1975.
12. Rongasani A., Plasienski J., Hasey M. Biochem. and Biophys. Research Comm., 26, 1—7, 1985.
13. Shoub M., Hartshorne D., Perry S. Biochem. J., 144, 263, 1967.
14. Oganessyan S. S., Barinyan S. B., Gevorgyan R. A., Davtyan I. S., Kaifad-jan M. J. Advances in Myocardiology, 439—454, 1992.
15. Weber K., Osborn M. J. Biol. Chem., 244, 4406, 1969.

Поступило 20.11 1987 г.

Бiolог. ж. Армении, т. 40, № 7, 559—565, 1987

УДК 577.15+591.39

ГОРМОНАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ МАЛАТДЕГИДРОГЕНАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ТКАНЯХ КРЫС

Л. Б. БУРНАЗЯН, А. В. АРЗТЮНЯН, Н. О. МОЗЕСЯН,
М. Г. УРГАНДЖЯН

Институт биохимии АН Армянской ССР, лаборатория азотистого обмена, Ереван

Аннотация — Тиреоидные гормоны и кортикостероиды принимают участие в регуляции активности малатдегидрогеназы. Активность митохондриального фермента в печени и почках на 12-м ч после введения кортикостероидов возрастает в 2—3 раза и постепенно снижается к 48-му часу. Аналогичные изменения наблюдаются в активности митохондриальной малатдегидрогеназы в мозге. Тиреоидные гормоны ингибируют активность малатдегидрогеназы как в митохондриальной, так и растворимой фракции мозга, а в печени и почках наблюдается как повышение активности фермента, так и отсутствие эффекта. ТГ и КС влияют на содержание множественных форм МДГ в мозге и почках.

Անոտացիա — Թիրեոիդ հորմոնները և կորտիկոստերոիդները մասնակցում են մալատդեհիդրոգենազների ակտիվության կարգավորմանը: Կորտիկոստերոիդների ներարկումից 12 ժամ հետո առնետի լյարդում և երիկամներում միտոքոնդրիալ ՄԴՀ ակտիվությունը բարձրացել է 2—3 անգամ, իսկ մինչև 48-րդ ժամը նկատվել է ակտիվության աստիճանական նվազեցում: Նման փոփոխություններ տեղի են ունեցել նաև է-ՄԴՀ ակտիվության հետ ուղեղում: Առնետի ուղեղի լուծելի և միտոքոնդրիալ ֆրակցիաներում ՄԴՀ ակտիվությունը արգելակվել է Թիրեոիդ հորմոնների ներկայությամբ, իսկ երիկամներում և լյարդում կամ փոփոխության դի ներարկվել, կամ էլ տեղի է ունեցել ֆերմենտի ակտիվության բարձրացում: Թիրեոիդ հորմոնները և կորտիկոստերոիդները ազդում են առնետի ուղեղի և երիկամների ՄԴՀ աարեր մոլեկուլյար ձևերի պարունակության վրա:

Abstract — Thyroid hormones and corticosteroids take part in the regulation of malate dehydrogenase activity. Administration of CS enhances to 2-3 fold mMDH activity in liver and kidney. In 12 hours, the enzyme ac-

tivity dropping back to usual level in 48 hours. Analogous changes are observed in the activity of mitochondrial malate dehydrogenase in the brain.

TH inhibits both cMDH and mMDH in brain tissue the effect is variable in liver and kidney and depends on the experimental conditions. The effect of TH and CS on the ratio of multiple forms of MDH in brain and kidney is detected.

Ключевые слова: гормоны тиреоидные, кортикостероиды, малатдегидрогеназа.

ПАД-зависимая малатдегидрогеназа (МДГ, КФ 1.1.1.37), являющаяся одним из ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот, представлена в организме двумя формами: митохондриальной и цитоплазматической (м-МДГ и ц-МДГ соответственно) [9, 14]. Эти изоферменты отличаются по ряду кинетических, иммунологических, хроматографических свойств, а также электрофоретической подвижностью. [18]. Установлено также, что в ряде тканей млекопитающих (печень, сердечная мышца, мозг и т. д.) изоферменты МДГ отличаются друг от друга гетерогенностью. Как растворимая, так и митохондриальная МДГ представлены в организме несколькими формами, характеризующимися различной молекулярной массой [12] и в большинстве случаев неодинаковой электрофоретической подвижностью [14].

Выяснению роли цитоплазматической и митохондриальной МДГ, а также их различных молекулярных форм в клеточном метаболизме в значительной мере может способствовать изучение путей их гормональной регуляции.

В настоящем сообщении приводятся данные, касающиеся влияния тиреоидных гормонов (ТГ) и кортикостероидов (КС) на активность ц-МДГ и м-МДГ и их молекулярных форм в печени, почках и мозге.

Материал и методика. Исследования проводились на цитоплазматической и митохондриальной фракциях мозга, почек и печени крыс, которые выделяли, как указано ранее [2]. Была изучена общая активность и изоферментный спектр МДГ после однократного введения гидрокортизона и кортизон-21-ацетата (Sevcal, 5 мг на 100 г массы животного, в различные сроки после введения (2, 5, 12, 24 и 48 ч), а также тироксина (T_4) и 3,3'-5-трийодтиронина— T_3 (0,5—1,0 мг на 100 г массы животного после 7-дневного введения). Общую активность МДГ определяли спектрофотометрическим методом по убыли или образованию ПАД-Н (340 нм) [1].

В опытах *in vitro* КС и ТГ использовались в концентрации 10^{-5} М. Молекулярные формы МДГ разделяли на полиакриламидном геле (7,5%) [8], окрашивание проводили фенол-метасульфат-тетразоловым методом [5], гели денситометрировали на кристалке к Спекорду *in vivo* [3]. Белок определяли по методу Лоури и соавт [10].

Результаты и обсуждение. В табл. I приведены данные о влиянии T_4 и T_3 на катализируемую МДГ реакцию окисления малата и восстановления оксалоацетата в растворимой и митохондриальной фракциях печени, почек и мозга. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ТГ неодинаково действуют на активность МДГ в исследуемых фракциях указанных органов. Обнаружено стимулирующее действие T_4 на активность МДГ в растворимой фракции печени и почек в прямой реакции и митохондриях печени в обратной реакции; T_4 же эффективен в отношении митондрий печени и почек в обратной реакции. Во всех этих случаях гормональный эффект не превышал 50%.

В ряде экспериментов как T_3 , так и T_4 оказывали выраженное ингибирующее влияние на активность МДГ как в прямой (митохондрии почек), так и в обратной реакции (митохондрии мозга). Причем характерно, что ингибирующий эффект T_4 был несколько выше по сравнению с T_3 и достигал 40—50%. В растворимой фракции мозга и митохондриях мозга и печени в прямой реакции, а также в растворимой фракции мозга и почек в обратной реакции T_4 несколько ингибировал активность фермента, тогда как T_3 был неэффективен. Наконец, в растворимой фракции печени T_4 ингибировал почти на 30% окисление малата, тогда как T_3 , как уже отмечалось, вызывал 50%-ное повышение активности МДГ во всех остальных случаях (табл. 1).

Таблица 1. Действие тиреоидных гормонов на активность МДГ (мкмоль кофермента/мг белка/мин) в опытах *in vitro*, $n = 10$

Органы	Фракции	Коферменты	Гормоны		
			контроль	T_3	T_4
Мозг	цитоплазма	НАД	0.41±0.01	0.39±0.01**	0.17±0.01***
		НАДН	3.20±0.04	2.92±0.01***	2.38±0.04***
	митохондрии	НАД	1.64±0.02	1.15±0.02***	1.16±0.02***
		НАДН	7.97±0.05	5.68±0.05***	4.98±0.05***
Печень	цитоплазма	НАД	0.63±0.01	0.94±0.02***	0.45±0.01***
		НАДН	2.06±0.04	1.74±0.04***	1.91±0.04***
	митохондрии	НАД	1.97±0.02	2.00±0.03	1.32±0.02**
		НАДН	4.02±0.05	4.86±0.05***	5.35±0.04***
Почки	цитоплазма	НАД	0.87±0.01	1.29±0.02***	0.97±0.03***
		НАДН	2.97±0.04	2.96±0.04	1.93±0.04***
	митохондрии	НАД	2.15±0.02	1.16±0.03**	1.11±0.04***
		НАДН	3.79±0.04	3.71±0.04	6.72±0.05***

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

При исследовании влияния гидрокортизона на активность растворимой и митохондриальной МДГ в исследуемых органах животных было установлено, что активность митохондриального фермента в реакции окисления малата через 2 ч после введения гормона понижается на 10—60%, через 5 ч повышается, превышая в печени контрольный уровень, а в мозге и почках приближаясь к нему (рис. 1, а).

На 12-м часу после введения гормона наблюдается резкое повышение активности фермента в печени и почках (в 2,2 и почти в 3 раза по сравнению с контролем соответственно), в мозге она также возрастает, не превышая, однако, контрольного уровня. Через 24 ч активность МДГ в печени и почках снижается, но в почках все еще превышает норму. Несмотря на дальнейшее понижение активности фермента, она и через 24 ч после введения гормона оказывается на 25% выше по сравнению с контролем. Активность ц-МДГ в этих условиях не претерпевает существенных изменений (рис. 1, б).

В активности МДГ, катализирующей реакцию восстановления оксалоацетата, происходят изменения, в основном сходные с теми, которые были обнаружены при окислении малата. Здесь наибольшее пониже-

ние активности фермента наблюдается через 5 ч после введения гидрокортизона, причем оно особенно проявляется в митохондриях мозга, где активность МДГ падает более чем в 3 раза (рис. 1, б). 12-й час после введения, так же как и в случае прямой реакции, является оптимальным сроком стимулирующего действия гормона на активность митохондриальной МДГ, она возрастает в почках, печени, мозге соответственно в

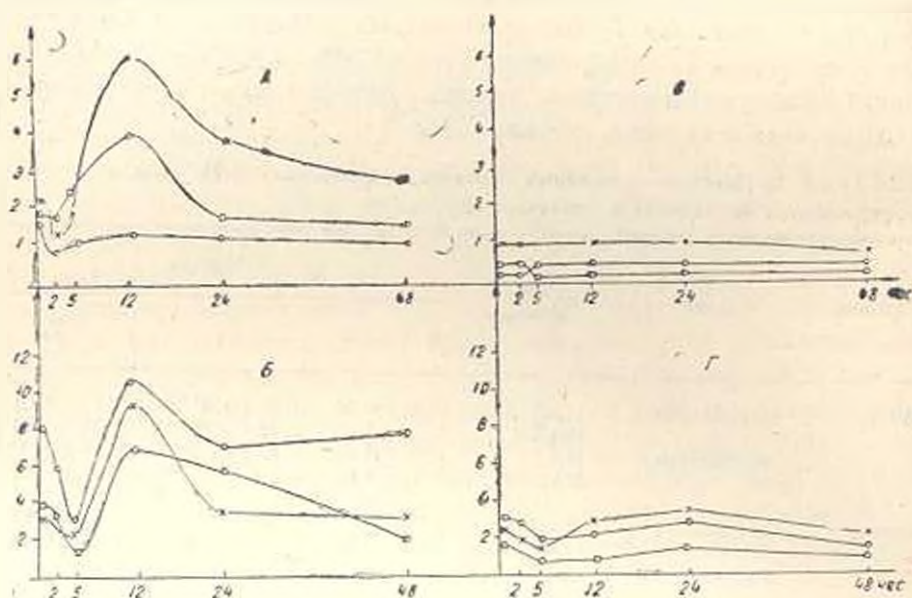


Рис. 1. Влияние гидрокортизона в опытах *in vivo* на активность МДГ ($\mu\text{моль кофермента/мг белка/час}$) в мозге, печени, почках крыс: а (митохондрии) и в (цитоплазма)—прямая реакция; б (митохондрии) и г (цитоплазма)—обратная реакция; —○—○— мозг; —■—■— печень; — — — — почки.

2,4, 1,7 и 1,5 раза по сравнению с контролем и в 4,2, 5,6 и 4,4 раза по сравнению с результатами, полученными при 5-часовом воздействии. Через 24 ч после введения гормона активность фермента в почках и мозге снижается, приближаясь к норме, но в печени изменяется незначительно, достигая контрольного уровня лишь к 48-му часу после воздействия. Характерно, что как и в описанной выше реакции окисления малата, гидрокортизон не оказывает стимулирующего влияния на активность НАД-зависимой ц-МДГ, катализирующей реакцию восстановления оксалоацетата (рис. 1, з). Следует отметить, что при этом в растворимой фракции почек и мозга на 5-м часу после введения гормона отмечается понижение активности фермента приблизительно на 40%. Полученные данные свидетельствуют о том, что м-МДГ печени и почек подвержена кортикостероидной индукции, так как на 12-м часу после введения гидрокортизона наблюдается отчетливо выраженное повышение активности фермента как в прямой, так и в обратной реакции. Ранее было обнаружено стимулирование м-МДГ коры почек при 3-дневном введении гидрокортизона [4], что в совокупности с полученными нами результатами указывает на фазный характер действия гормона, ибо установлено его ингибирующее влияние на активность МДГ в первые часы после

введения (2—5 ч), стимулирующее действие на 12-м часу, нормализующий эффект через 24—48 ч с последующим повышением при 3-дневном введении. Индуцирующее влияние гидрокортизона на активность м-МДГ особенно наглядно проявляется в обратной реакции восстановления оксалоацетата. Однако и при использовании НАД в качестве кофактора м-МДГ можно констатировать индукцию фермента, если учесть, что активность его заметно снижается через 24 ч после введения гормона и вновь возрастает к 12-му часу более чем в 2,3 раза. Не исключено, что в ряде случаев с индукцией может быть связано и действие ТГ (эффект T_3 на активность ц-МДГ и T_4 на активность м-МДГ печени и почек). В этой связи следует отметить ранее установленное повышение активности м-МДГ почек, селезенки, желудка, тонкого кишечника и ц-МДГ скелетных мышц при 1-дневном скормливанием белым крысам корма, содержащего 2%-ный экстракт высушенной щитовидной железы [11].

Известно, что введение животным ТГ, в частности T_3 , приводит к изменению изоферментного спектра лактатдегидрогеназы печени [6]. В связи с этим представляло интерес выяснение вопроса о влиянии изменения активности МДГ при введении гормонов на содержание отдельных молекулярных форм растворимого и митохондриального фермента. Нами были отобраны случаи с максимальным проявлением гормонального эффекта (рис. 2). На рис. 2 приведены данные о влиянии T_4 на со-

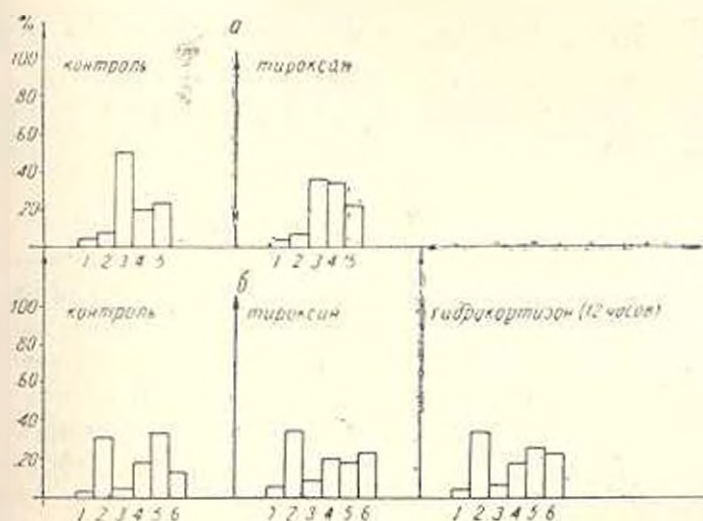


Рис. 2. Действие тироксина и гидрокортизона на содержание различных фракций МДГ (в %) в цитоплазме мозговой ткани (а) и митохондриях почек (б).

держание молекулярных форм ц-МДГ мозга, а также гидрокортизона на фракционный состав м-МДГ почек. Установлено, что в соответствии с электрофоретической подвижностью ц-МДГ мозга имеет 5, а м-МДГ почек—6 фракций. Исследуемые гормоны, почти не влияя на анодные фракции фермента, вызывают изменения в содержании отдельных катодных фракций. Примечательно, что повышение ферментативной активности (эффект T_4 и гидрокортизона на 12-м часу после введения)

сопровождается увеличением содержания 6-й формы и снижением содержания 5-й формы м-МДГ без существенного изменения уровня остальных фракций. В случае же понижения активности фермента под влиянием гормона (действие T_4 на ц-МДГ мозга) уменьшается содержание 3-й фракции и повышается уровень 4-й. В содержании же 5-й фракции, так же как и остальных форм фермента, заметного изменения не происходит. Примечательно, что, согласно ранее установленным фактам, в печени и мозге растущих животных гидрокортизон оказывает неодинаковое регулирующее влияние на множественные формы МДГ [13]. В табл. 2 представлены результаты изучения влияния T_1

Таблица 2. Действие гидрокортизона и тиреоидных гормонов (мкмоль кофермента/мг белка/мин) в опытах *in vitro*, $n=10$.

Органы	Фракции	Ко ферменты	Гормоны			
			контроль	гидрокортизон	T_2	T_4
Мозг	цитоплазма	НАД	0.41 ± 0.01	0.38 ± 0.01	$0.35 \pm 0.01^{**}$	$0.32 \pm 0.01^{***}$
		НАДН	3.2 ± 0.04	$2.79 \pm 0.04^{**}$	$2.10 \pm 0.04^{**}$	$1.85 \pm 0.05^{***}$
	митохондрии	НАД	1.61 ± 0.02	$1.17 \pm 0.02^{***}$	$1.23 \pm 0.02^{***}$	$1.07 \pm 0.03^{***}$
		НАДН	7.90 ± 0.05	$7.60 \pm 0.06^{**}$	$6.14 \pm 0.06^{**}$	$4.35 \pm 0.06^{***}$
Печень	цитоплазма	НАД	0.63 ± 0.01	0.62 ± 0.01	$0.52 \pm 0.01^{**}$	$0.49 \pm 0.01^{***}$
		НАДН	2.06 ± 0.01	$1.08 \pm 0.04^{**}$	$1.15 \pm 0.05^{**}$	$1.01 \pm 0.05^{**}$
	митохондрии	НАД	1.97 ± 0.02	$1.74 \pm 0.02^{***}$	$1.56 \pm 0.02^{***}$	$1.42 \pm 0.03^{***}$
		НАДН	4.02 ± 0.05	$2.08 \pm 0.05^{***}$	$3.10 \pm 0.04^{***}$	$2.73 \pm 0.05^{***}$
Почки	цитоплазма	НАД	0.87 ± 0.01	$0.73 \pm 0.02^{**}$	$0.76 \pm 0.02^{**}$	$0.76 \pm 0.02^{**}$
		НАДН	2.67 ± 0.14	$3.21 \pm 0.05^{**}$	$1.80 \pm 0.05^{**}$	$1.90 \pm 0.05^{***}$
	митохондрии	НАД	1.15 ± 0.02	$2.03 \pm 0.03^{**}$	$1.95 \pm 0.04^{**}$	$1.75 \pm 0.03^{***}$
		НАДН	3.79 ± 0.14	$3.12 \pm 0.05^{***}$	$3.26 \pm 0.05^{***}$	$3.04 \pm 0.05^{***}$

$^{**} P < 0.01$, $^{***} P < 0.001$.

(T_2 и T_4) и кортикостероидов (гидрокортизон и кортизон) на активность МДГ в опытах *in vitro*. При этом учитывалось, что одним из механизмов гормональных эффектов при их введении в организм является непосредственное влияние накапливающегося в тканях-мишенях гормона на ферменты. Как видно, T_1 в концентрации 10^{-5} М во всех исследуемых органах ингибирует активность фермента, катализирующего малатдегидрогеназную реакцию в обоих направлениях. Эффект T_4 несколько превышает таковой T_2 , что особенно выражено в митохондриях, растворимой фракции мозга и печени. Гидрокортизон также оказывает ингибирующее действие на активность МДГ, которое, в отличие от эффекта T_1 , оказывалось слабее, если не считать сдвигов, отмечавшихся в растворимой и митохондриальной фракциях печени. Следует отметить, что в литературе имеются указания об ингибирующем действии тироксина на активность митохондриальной МДГ из сердечной мышцы [15]. Ранее ингибирование МДГ, так же как и других металло-содержащих дегидрогеназ, в присутствии тироксина объясняли его хелатирующими свойствами, обуславливающими комплексообразование с металлом в молекуле фермента [17]. Впоследствии, когда было обнаружено, что ингибирование МДГ наступает не только под влиянием T_4 ,

его производных, но и молекулярного йода, были предложены другие механизмы этого явления. В экспериментах с очищенной м-МДГ из сердечной мышцы свиньи было установлено, что инактивация фермента наступает при окислении под влиянием йодсодержащих соединений 0-ти из 14-ти имеющихся в молекуле фермента SH-групп [16]. При этом отмечалась дезагрегация фермента на неактивные субъединицы [7]. Было показано также, что при инкубации м-МДГ из сердечной мышцы свиньи с эфиром тироксина метилтироксингидрохлоридом наблюдается 90%-ное ингибирование активности фермента вследствие связывания двух аминокрупп на стереоспецифическом рецепторном участке. Установлено, что присоединение тироксина приводит к инактивации в результате снижения скорости связывания ферментом НАД [15].

ЛИТЕРАТУРА

1. Кочетков Г. А. Практическое руководство по энзимологии. М., 1971.
2. Мовсисян С. Г., Бурназян Л. Б. Вопросы биохимии мозга, 19, 84—90, Ереван, 1975.
3. Мовсисян Н. О., Хузарян М. А., Мовсисян С. Г. Лабор. дело, 7, 445, М., 1976.
4. Усатенко М. С., Цончева А. В. Вopr. мед. химии, 29, 4, 401—406, 1974.
5. Юрков Ю. А., Волкова Л. Д. Лабор. дело, М., 11, 646, 1973.
6. Allison M. S., Gerszten E., Sanchez B. Endocrinology, 74, 87, 1964.
7. Covelli J., Consiglio E., Varrone S. BBA, 184, 678, 1969.
8. Davis B. Y. Ann. New York Acad. Sci., 121, 404, 1964.
9. Kitto G. B. and Kaplan N. O. Biochemistry 5, 3906—3980, 1966.
10. Lowry O. H., Rosebrough N. Y., Farr A. L. and Randall R. J. J. Biol. Chem., 19, 265, 1951.
11. Loos Y. P., Lardy U. A. J. Biol. Chem., 249, 3, 1427—1436, 1965.
12. Moore R. O., Villee C. A. Science, 142, 389—390, 3586, 1963.
13. Sharma R., Palnait S. K. Development Growth and differentiation multilingual Journal, 24, 5, 501, 1982.
14. Thorne C. J. N., Grossman L. I., Kaplan N. O. BBA, 73, 193—203, № 2, 1963.
15. Ullman E. F. et al. BBA, 567, 66—74, 1979.
16. Varrone S. et al. Eur. J. Biochem., 15, 305—312, 1970.
17. Wolff E. C., Bail E. G. J. Biol. Chem., 224, 1083—1098, 1957.
18. Wieland T., Pfelderer G., Hompt W., Wörner W., Biochem. Z., 331, 103—109, 1959.

Получено 3.1 1986 г.

Зоол. ж. Армения, т. 40, № 7, 565—571, 1987 УДК 619.616 - 006.146 - 002.6/636.2

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЛИМФОЛЕЙКОЗА НА БЕЛЫХ КРЫСАХ

Э. Д. СТЕПАНИН, Р. А. ПЕТРОСЯН, Л. П. ЕДЖАНОВА,
А. С. АХВЕРДЯН

Арм. НИИВ, лаборатория лейкоза животных, Ереван

Аннотация — Выяснена реальная возможность моделирования лимфолейкоза крупного рогатого скота на белых крысах. Определено значение способов предотвращения свертываемости лейкозной крови в биологических эффектах ее действия на организм. Установлена степень выраженности лейкозным началом элементов белой крови больных лимфолейкозом человека и крупного рогатого скота.