

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

УДК 612.018.2:577.175.621.014.08

Л. Е. Панин, О. М. Хоценко, И. Ф. Уснин

РОЛЬ АПОЛИПОПРОТЕИНА А-I В РЕАЛИЗАЦИИ АНАБОЛИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ

Лаборатория молекулярных механизмов межклеточных взаимодействий, НИИ биохимии СО РАМН, Новосибирск

Ранее было показано, что часть стероидных гормонов связывается с липопротеинами крови, в первую очередь с липопротеинами высокой плотности — ЛПВП (Панин Л. Е. и соавт., 1988). Стероидные гормоны вместе с ЛПВП захватываются резидентными макрофагами печени, где во вторичных лизосомах ЛПВП подвергаются дезинтеграции с образованием аполипопротеина А-I (apoA-I), а стероидные гормоны восстанавливают Δ^4 , 3-кетогруппировку при участии 5 α - и 5 β -редуктаз с образованием тетрагидросоединений. В данной работе предпринята попытка показать роль комплекса некоторых стероидных гормонов с apoA-I в реализации анаболического действия этих стероидных гормонов. Исследования проведены на культуре гепатоцитов и совместной культуре гепатоцитов и клеток Купфера, изолированных из печени крыс-самцов Вистар массой 180–200 г.

Такие стероидные гормоны с анаболическим действием, как андростерон, дегидроэпиандростерон, дегидроэпиандростерон сульфат и тетрагидрокортизол, в составе комплекса с apoA-I увеличивали скорость биосинтеза белка, а дегидроэпиандростерона сульфат и тетрагидрокортизол повышали также скорость синтеза ДНК в культуре гепатоцитов. Все гормоны имели в структуре А-кольца восстановленную Δ^4 , 3-кетогруппировку. Восстановление этой группы стероидных гормонов и образование комплекса их с apoA-I связаны с действием резидентных макрофагов (клеток Купфера). Именно поэтому добавление ЛПВП (источник apoA-I) и кортизола (источник восстановленной формы — тетрагидрокортизола) к сокультуре гепатоцитов и макрофагов при одновременной стимуляции последних липополисахаридом приводила к выраженному повышению скорости биосинтеза белка и ДНК. Полученные результаты указывают на важную роль Δ^4 -кетогруппировки А-кольца стероидных гормонов и комплекса их с apoA-I в реализации анаболического действия стероидов.

As early shown, a portion of steroid hormones binds to blood lipoproteins, primarily to high-density lipoproteins (HDL) [Panin et al. 1988]. Steroid hormones together with HDL are captured by resident macrophages of the liver where in secondary lysosomes HDL are degraded to form apoA-I and steroid hormones restore a Δ^4 , 3-keto group with the participation of 5- α and 5 β -reductases to give rise to tetrahydro compounds. In this study, an attempt was undertaken to show a role of a complex of some steroid hormones with apoA-I in realization of the anabolic action of these steroid hormones by using the cultured hepatocytes and concurrently cultured hepatocytes and Kupffer's cells isolated from the liver of male Wistar rats weighing 180–200 g.

Steroid hormones having an anabolic action, such as androstosterone, dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate and tetrahydrocortisol as ingredients of a complex with apolipoprotein A-I (apoA-I), increased the rate of protein biosynthesis and dehydroepiandrosterone sulfate and tetrahydrocortisol also did the rate of DNA synthesis in the cultured hepatocytes. All the hormones had a restored Δ^4 , 3-keto group in the A ring structure. Restoration of this group of steroid hormones and formation of their complex with apoA-I are associated with the action of resident macrophages (Kupffer's cells). That is the reason that addition of HDL (a source of apoA-I) and cortisol (a source of the restored form — tetrahydrocortisol) to the coculture of hepatocytes and macrophages, by concurrently stimulating the latter by lipopolysaccharide led to a significant increase in the rate of protein and DNA biosynthesis. The findings show an important role of a Δ^4 , 3-keto group of the A ring of steroid hormones and their complex with apoA-I in realizing the anabolic action of steroids.

Считается, что стероидные гормоны в сыворотке крови переносятся с помощью специального белка — транскортина [10]. Попадая в клетки органов-мишеней, они взаимодействуют со специфическими внутриклеточными рецепторами, транспортируются в ядро, где и усиливают экспрессию определенных генов [3]. Однако было показано, что часть стероидных гормонов связывается и транспортируется липопротеинами крови [4]. К ним прежде всего следует отнести липопротеины высокой плотности (ЛПВП). Показано, что $K_{\text{св}}$ стероидных гормонов с ЛПВП составляет $(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ [8]. Стероидные гормоны вместе с ЛПВП захватываются резидентными макрофагами печени (клетки Купфера) с помощью рецепторопосредованного эндоцитоза. Стимулированные липополисахаридами (ЛПС) макрофаги особенно активно захватывают ЛПВП [8]. Во вторичных лизосомах ЛПВП подвергаются дезинтеграции с образованием аполипопротеина А-I (apoA-I), а стероидные гормоны восстанавливают Δ^4 , 3-кетогруппировку при участии 5 α - и 5 β -редуктаз с образованием тетрагидросоединений [18]. Образовавшийся комплекс тетрагидрокортизол—apoA-I попадает в интерстициальное пространство, захватывается соматическими клетками (гепатоцитами), переносится в ядро и участвует в усилении экспрессии генов [6, 8].

Результатами последних исследований показано, что во фракции кислых негистоновых белков, полученных из ядер клеток различных тканей, присутствует 2 белка с apoA-I-иммунореактивностью [7]. Один белок с мол. массой 28 кД присутствует в транскрипционно активном хроматине и ядерном матриксе, другой — с мол. массой около 14 кД — в транскрипционно не-

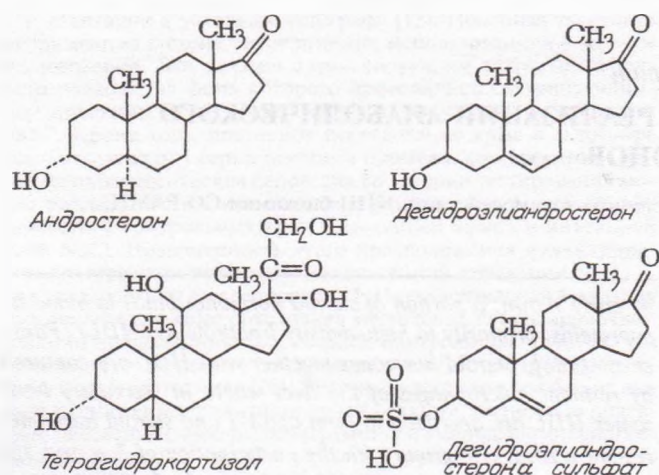
активном хроматине [5]. Первый белок соответствует сывороточному apoA-I, второй, вероятно, является продуктом его лимитированного протеолиза.

В данной работе предпринята попытка показать роль комплекса некоторых стероидных гормонов с apoA-I в реализации анаболического действия этих стероидных гормонов.

Материалы и методы

Исследования проведены на культуре гепатоцитов и совместной культуре гепатоцитов и клеток Купфера, изолированных из печени крыс-самцов Вистар массой 180–200 г. Изолированные клетки печени получали ферментативным способом по методу M. Berry и D. Friend [13] в нашей модификации [11], проводя рециркуляционную перфузию органа 0,03% раствором коллагеназы ("Sigma", США). После диссоциации ткани гепатоциты отделяли от непаренхиматозных клеток с помощью дифференциального центрифугирования. Непаренхиматозные клетки фракционировали в элютирующем роторе JE-6 на центрифуге J2-21 ("Beckman", США) при скорости вращения ротора 623g. Для отмывки купферовских и эндотелиальных клеток использовали скорость прокачивания буфера 22 и 42 мл/мин соответственно [16]. Жизнеспособность клеток оценивали методом исключения трипанового синего, а чистоту клеточных фракций — с помощью световой и электронной микроскопии.

Полученные клетки ресуспендировали в среде RPMI-1640 pH 7,4, содержащей 15 мМ NEPES, 5% сыворотки крупного рогатого скота, 2 мМ глутамин и 50 мкг/мл гентамицина. Для ин-



кубации клеток использовали 24-луночные планшеты ("Linbro", США), предварительно покрытые коллагеном. Клетки инкубировали в CO_2 -инкубаторе в атмосфере CO_2 (5%) и O_2 (95%) при 37°C в среде, содержащей гормоны в концентрации 10^{-6} М, ЛПВП — 100 мкг/мл, апоА-I — 100 мкг/мл. Для стимуляции макрофагов использовали ЛПС, полученный из *Serratia marcescens* ("Sigma", США). Каждые 24 ч инкубации проводили смену среды на идентичную. Для измерения скорости биосинтеза белка в культуру клеток за 2 ч до окончания инкубации добавляли 37 кБк/мл [^{14}C]-лейцина (Чехия). Для измерения скорости синтеза ДНК в культуру клеток за 20 ч до окончания инкубации добавляли 37 кБк/мл [^3H]-тимидина ("Нуклон", Москва). Часть содержимого лунки переносили на мембранные фильтры для определения связанной с белком или с ДНК радиоактивности. Радиоактивность проб измеряли в жидкостном сцинтилляционном счетчике ("Mark-III", США). Для расчета удельной радиоактивности белок определяли по методу О. Lowry [17] и выражали в имп/мин на 1 мг белка, ДНК — по методу Burton [14] и выражали в имп/мин на 1 мкг ДНК.

Гормоны для исследования подбирали таким образом, чтобы Δ^4 , 3-кетогруппа в А-кольце была восстановленной. Этим требованиям соответствовали такие гормоны, как андростерон, дегидроэпиандростерон, тетрагидрокортизол. Кроме того, использовали также сульфатированную форму дегидроэпиандростерона, в которой гидроксил в С3-положении заменен на остаток серной кислоты. В этом случае активная гидроксильная группа была связана не с углеродным атомом кольца А, а с атомом серы (см. рисунок). Предполагалось, что ОН-группа гормонов в С3-положении может конкурентно участвовать в образовании водородных связей с азотистыми основаниями ДНК, приводя к разрыву последних в комплементарных парах ГЦ-типа [6]. Данный механизм может рассматриваться как фактор инициации транскрипции. В работе использовали дегидроэпиандростерон ("Amersham", Англия) и дегидроэпиандростерона сульфат ("Sigma", США). Андростерон и тетрагидрокортизол были любезно предоставлены акад. РАМН Ю. А. Панковым.

Препаративное выделение ЛПВП из сыворотки крови осуществляли с помощью изоплотностного ультрацентрифугирования в растворе KBr [15] в роторе 75 Ti на ультрацентрифуге L5-75 ("Beckman", США). Делипидирование ЛПВП проводили охлажденной до -16°C смесью хлороформ—метанол (2:1) с последующей многократной отмывкой эфиром. АпоА-I получали методом гель-фильтрации на сефарозе 4В ("Pharmacia", Швеция) в 0,01 М трис- HCl -буфере pH 8,6, содержащем 6 М мочевины. Пик 2, соответствующий апоА-I, повторно очищали путем ионообменной хроматографии на DEAE-Toyopearl 650 М (TSK, Япония), уравновешенной 0,01 М трис- HCl pH 8,6, с 6 М мочевиной. Элюирование проводили исходным буфером с линейным градиентом от 0,01 до 0,5 М NaCl .

Достоверность полученных данных оценивали с помощью t -критерия Стьюдента при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Андростерон является метаболитом мужских половых гормонов — тестостерона и андростендиона — и относится к анаболикам. Андрогенная активность его составляет 10% активности тестостерона. Принципиальное отличие его от тестостерона

— это восстановления Δ^4 , 3-кетогруппировка в А-кольце. Дегидроэпиандростерон — гормон сетчатой зоны коры надпочечников, секретируемый в сульфатированной форме. Десульфатирование дегидроэпиандростерона происходит в резидентных макрофагах, главным образом в клетках Купфера. Гормон оказывает выраженное анаболическое действие. Тетрагидрокортизол является метаболитом кортизола и считается метаболически неактивным продуктом его деградации [12]. Существенное отличие от последнего — восстановленная Δ^4 , 3-кетогруппировка в А-кольце гормона. Процесс восстановления протекает в макрофагах и связан с активностью 5α - и 5β -редуктаз [18].

Ранее было показано, что стероидные гормоны легко взаимодействуют с липопротеинами крови, в первую очередь с ЛПВП [4]. Белком, с которым идет комплексообразование, является апоА-I. $K_{\text{асс}}$ составляет $(0,4 \pm 0,1) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ [2]. Это несколько ниже, чем $K_{\text{асс}}$ гормонов с ЛПВП, что, вероятно, связано с некоторыми структурными изменениями аполипопротеинов при делипидировании ЛПВП.

Проведенные исследования показали, что стероидные гормоны с анаболическим действием не изменяли скорости биосинтеза белка в первичной культуре гепатоцитов (табл. 1). Исключение составлял дегидроэпиандростерон, который достоверно увеличивал скорость включения меченного [^{14}C]-лейцина в белок. Присутствие в среде инкубации апоА-I достоверно снижало включение метки в белок, что, вероятно, обусловлено неспецифическим связыванием [^{14}C]-лейцина с апоА-I. Добавление в среду инкубации анаболиков совместно с апоА-I во всех случаях увеличивало скорость биосинтеза белка. Последняя прогрессивно возрастала в ряду андростерон → дегидроэпиандростерон → тетрагидрокортизол → дегидроэпиандростерона сульфат.

Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что для проявления анаболического действия гормонов необходим комплекс их с апоА-I. В проявлении данного эффекта важную роль играет восстановление Δ^4 , 3-кетогруппировки А-кольца. В исследованиях, проведенных ранее, было показано, что кортизол не оказывал влияния на биосинтез белка [6]. По результатам данного эксперимента, высокой активностью обладал тетрагидрокортизол — гормон, в котором ОН-группа в С3-положении находилась в транс-, а водород у С5-атома — в цис-положении. Наибольшая активность обнаружена у дегидроэпиандростерона сульфата, у которого ОН-группа в С3-положении связана с атомом серы.

Увеличение биосинтеза белка под влиянием анаболических стероидов, несомненно, связано с усилением внутриклеточной регенерации [9]. Однако оно имеет отношение и к пролиферации клеток. Известно, что усиление биосинтеза белка предшествует усилению синтеза ДНК в клеточном цикле [1]. Учитывая это обстоятельство, было проведено изучение влияния анаболических стероидов на скорость включения [^3H]-тимидина в ДНК гепатоцитов. Проведенные исследования показали, что общая картина изменений соответствует вышеописанной, но в количественном отношении менее выражена (табл. 2). В суточной культуре гепатоцитов добавление стероидных гормонов даже несколько снижало скорость синтеза ДНК. При этом добавление анаболических стероидов в среду инкубации совместно с

Таблица 1

Влияние различных гормонов и апоА-I на скорость биосинтеза белка в культуре гепатоцитов ($M \pm m$; $n = 6$)

Условия инкубации	Включение [^{14}C]-лейцина в белок, имп/мин на 1 мг белка	
	без апоА-I	в присутствии апоА-I
Контроль	6841 $\pm$ 393	3 474 $\pm$ 189**
Андростерон	6084 $\pm$ 365	4 338 $\pm$ 310***
Дегидроэпиандростерон	8973 $\pm$ 415*	5 787 $\pm$ 570***
Дегидроэпиандростерона сульфат	7668 $\pm$ 559	16 938 $\pm$ 1341***
Тетрагидрокортизол	6228 $\pm$ 390	9 898 $\pm$ 972***

Примечание. Здесь и в табл. 2: звездочки — достоверность ($p < 0,05$) различий: одна — с контролем внутри группы, две — между группами.

Таблица 2

Влияние различных гормонов и апоА-I на скорость синтеза ДНК в культуре гепатоцитов ($M \pm m$; $n = 6$)

Условия инкубации	Включение [^3H]-тимидина в ДНК, имп/мин на 1 мкг ДНК	
	без апоА-I	в присутствии апоА-I
Контроль	212 $\pm$ 8	158 $\pm$ 22**
Андростерон	177 $\pm$ 9*	200 $\pm$ 20
Дегидроэпиандростерон	205 $\pm$ 6	160 $\pm$ 8**
Дегидроэпиандростерона сульфат	158 $\pm$ 13*	234 $\pm$ 5***
Тетрагидрокортизол	159 $\pm$ 15*	235 $\pm$ 5***

Таблица 3

Влияние кортизола, ЛПВП и ЛПС на скорость биосинтеза белка в культуре гепатоцитов и сокультуре гепатоцитов и макрофагов в различные сроки ($M \pm m$; $n = 6$)

Условия инкубации	Включение [^{14}C]-лейцина в белок, имп/мин на 1 мг белка			
	гепатоциты		гепатоциты + макрофаги	
	1-е сутки	3-и сутки	1-е сутки	3-и сутки
Контроль	6900 $\pm$ 510	6790 $\pm$ 450	7570 $\pm$ 310	7 520 $\pm$ 430
ЛПВП	6570 $\pm$ 420	6440 $\pm$ 210	6270 $\pm$ 500*	6 490 $\pm$ 560
ЛПВП + ЛПС	6950 $\pm$ 540	6730 $\pm$ 290	7220 $\pm$ 410	7 390 $\pm$ 520
ЛПВП + кортизол	6370 $\pm$ 320	6470 $\pm$ 400	6010 $\pm$ 470*	5880 $\pm$ 330*
ЛПВП + кортизол + ЛПС	4880 $\pm$ 270*	4390 $\pm$ 190*	9770 $\pm$ 630*	12 920 $\pm$ 570***

Примечание. Здесь и в табл. 4: звездочки — достоверность ($p < 0,05$) различий: одна — с контролем, две — между сутками.

апоА-I оказывало иное действие. В суточной культуре андростерон и дегидроэпиандростерон не влияли на синтез ДНК, тогда как дегидроэпиандростерона сульфат и тетрагидрокортизол достоверно его увеличивали. Таким образом, проведенные исследования позволяют предположить, что один и тот же механизм лежит в основе как внутриклеточной регенерации, так и клеточной пролиферации.

Известно, что гепатоциты не содержат 5α - и 5β -редуктаз, поэтому восстановление Δ^4 , 3-кетогруппировки стероидов является исключительно привилегией макрофагов. С целью изучения роли процессов восстановления Δ^4 , 3-кетогруппировки в механизме анаболического действия гормонов мы использовали одновременно первичную культуру гепатоцитов и сокультуру их с макрофагами. В этом случае для изучения анаболического эффекта в среду инкубации добавляли ЛПВП — источник апоА-I и кортизол — источник восстановленной формы гормона тетрагидрокортизола. Для усиления активного захвата ЛПВП и гормона макрофаги стимулировали добавлением ЛПС. Проведенные исследования показали, что в первичной культуре гепатоцитов скорость биосинтеза белка в течение первых 3 сут не изменялась (табл. 3). Добавление в среду инкубации ЛПВП, ЛПВП и ЛПС или ЛПВП и кортизола не изменяло скорость биосинтеза белка. Одновременное добавление в среду инкубации ЛПВП, кортизола и ЛПС даже несколько снижало ее, что, вероятно, обусловлено неспецифическим связыванием [^{14}C]-лейцина. В сокультуре гепатоцитов и макрофагов как в 1-е, так и на 3-и сутки инкубации не наблюдалось усиления биосинтеза белка при добавлении ЛПВП, ЛПВП и ЛПС, ЛПВП и кортизола. В ряде случаев отмечено даже некоторое снижение. Однако одновременное добавление в среду инкубации ЛПВП, кортизола и ЛПС приводило к достоверному увеличению биосин-

Таблица 4

Влияние кортизола, ЛПВП и ЛПС на скорость синтеза ДНК в культуре гепатоцитов и сокультуре гепатоцитов и макрофагов в различные сроки ($M \pm m$; $n = 6$)

Условия инкубации	Включение [^3H]-тимидина в ДНК, имп/мин на 1 мкг ДНК			
	гепатоциты		гепатоциты + макрофаги	
	1-е сутки	3-и сутки	1-е сутки	3-и сутки
Контроль	200 $\pm$ 17	170 $\pm$ 11	202 $\pm$ 13	105 $\pm$ 10**
ЛПВП	187 $\pm$ 13	163 $\pm$ 14	140 $\pm$ 11*	103 $\pm$ 8**
ЛПВП + ЛПС	173 $\pm$ 15	157 $\pm$ 14	191 $\pm$ 8	116 $\pm$ 15**
ЛПВП + кортизол	171 $\pm$ 13	158 $\pm$ 10	208 $\pm$ 10	121 $\pm$ 7**
ЛПВП + кортизол + ЛПС	130 $\pm$ 12*	149 $\pm$ 12	186 $\pm$ 13	132 $\pm$ 9***

теза белка в 1-е сутки и к еще более значительному увеличению на 3-и сутки инкубации (см. табл. 3).

Аналогичная ситуация складывалась при анализе влияния тех же добавок на скорость включения [^3H]-тимидина в ДНК (табл. 4). В первичной культуре гепатоцитов никакие добавки не оказывали влияния на скорость синтеза ДНК. В случае одновременного добавления ЛПВП, кортизола и ЛПС отмечали даже достоверное снижение скорости в 1-е сутки. Увеличение продолжительности инкубации также снижало скорость синтеза ДНК в культуре, не содержащей добавок. В сокультуре гепатоцитов и макрофагов общая картина изменений сохранялась. Однако одновременное добавление в среду инкубации ЛПВП, кортизола и ЛПС приводило к достоверному увеличению синтеза ДНК на 3-и сутки инкубации. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что макрофаги занимают ключевые позиции в реализации анаболического действия стероидных гормонов в связи с уникальной способностью восстанавливать Δ^4 , 3-кетогруппировку стероидных гормонов.

Заключение

Таким образом, в данной модели анаболический эффект стероидных гормонов проявляется только в том случае, если они входят в состав комплекса с апоА-I. В механизме анаболического действия стероидных гормонов важную роль играет восстановление Δ^4 , 3-кетогруппировки А-кольца гормонов. Процесс восстановления тесно связан с активностью резидентных макрофагов, которая значительно усиливается под влиянием ЛПС. Описанный механизм лежит в основе анаболического действия как андрогенов, так и стероидных гормонов коры надпочечников. Наиболее активным анаболиком является сульфатированная форма дегидроэпиандростерона. Тетрагидрокортизол, имеющий ОН-группу у С3-атома в транс-позиции, а водород у С5-атома в цис-позиции, является метаболически активным гормоном, усиливающим скорость биосинтеза как белка, так и ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зосимовская А. И. Клеточный цикл. — М., 1973.
2. Иванова Н. Г., Поляков Л. М., Панин Л. Е. // Укр. биохим. журн. — 1991. — Т. 63. — С. 103–105.
3. Мертаевцев Н. П. Регуляция экспрессии генов стероидными гормонами. — Новосибирск, 1990.
4. Панин Л. Е., Поляков Л. М., Розуменко А. А., Биушкина Н. Г. // Вопр. мед. химии. — 1988. — № 5. — С. 56–58.
5. Панин Л. Е., Поляков Л. М., Кузьменко А. П. и др. // Биохимия. — 1992. — Т. 57. — С. 826–831.
6. Панин Л. Е., Тузиков Ф. В., Тузикова Н. А. и др. // Молекул. биол. — 1999. — Т. 33. — С. 1–6.
7. Панин Л. Е., Русских Г. С., Поляков Л. М. // Биохимия. — 2000. — Т. 65. — С. 1684–1689.
8. Панин Л. Е., Максимов В. Ф., Коростышева И. М. // Цитология. — 2000. — Т. 42. — С. 461–467.

9. Саркисов Д. С. Очерки по структурным основам гомеостаза. — М., 1977.
10. Сергеев П. В., Галенко-Ярошевский П. А., Шимановский Н. Л. Очерки биохимической фармакологии. — М., 1996.
11. Усынин И. Ф. Новые методы научных исследований в клинической и экспериментальной медицине. — Новосибирск, 1980. — С. 96—98.
12. Юдаев Н. А., Афиногенова С. А., Крехова М. А. Биохимия гормонов и гормональной регуляции. — М., 1976.
13. Berry M. N., Friend D. S. // J. Cell Biol. — 1969. — Vol. 43. — P. 506—519.
14. Gendimenico G. J., Bouquin P. L., Trampusch K. M. // Anal. Biochem. — 1988. — Vol. 173. — P. 45—48.
15. Hatch F. T., Lees R. S. // Advanc. Lipid. Res. — 1968. — Vol. 6. — P. 2—68.
16. Knook D. L., Sleyster E. Ch. // Exp. Cell Res. — 1976. — Vol. 99. — P. 444—449.
17. Lowry O. H., Rosebrough N. G., Farr A. L., Randall R. J. // J. Biol. Chem. — 1951. — Vol. 193. — P. 265—275.
18. Nabors D. J., Berliner D. L., Dougherty T. F. // J. Reticuloend. Soc. — 1967. — Vol. 4. — P. 237—253.

Поступила 27.07.01

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2002

УДК 615.31:546.47].03:616.379-008.64].015.4.076.9

А. А. Самигжонов, М. Ж. Эргашева, Т. С. Саатов

ВЛИЯНИЕ КООРДИНАЦИОННОГО СОЕДИНЕНИЯ ЦИНКА НА ПОГЛОЩЕНИЕ ГЛЮКОЗЫ И АКТИВНОСТЬ ПИРУВАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ ТКАНЕЙ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Институт биохимии АН Республики Узбекистан, Ташкент

Изучено влияние соединения цинка на процесс транспорта глюкозы через мембрану и активность пируватдегидрогеназы митохондрий сердца и скелетных мышц крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Объектом исследований явились диафрагма, митохондрии сердца, скелетных мышц крыс.

Целью работы было изучение влияния координационного соединения цинка—пирацина на транспорт глюкозы в диафрагме и на активность пируватдегидрогеназы сердца и скелетных мышц крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Экспериментальный сахарный диабет вызывали внутрибрюшинным введением аллоксана гидрата на фоне голодания.

В результате исследований установлено, что пирацин оказывает стимулирующее влияние на транспорт глюкозы в условиях экспериментального диабета. Под действием координационного соединения цинка наблюдалось повышение сниженной при диабете активности пируватдегидрогеназы.

Полученные результаты еще раз подтверждают роль ионов цинка в процессе транспорта и окисления глюкозы.

Zinc compounds were examined for their effects on the transport of glucose through the membrane and on the activity of pyruvate dehydrogenase of mitochondria of the hearts and skeletal muscles from rats with experimental diabetes mellitus. The objects of the investigations were the rat diaphragm, cardiac and skeletal muscle mitochondria.

The aim of the investigation was to study the effect of the coordination zinc compound piracine on the transport of glucose in the diaphragm and on the activity of pyruvate dehydrogenase of the hearts and skeletal muscles from rats with experimental diabetes mellitus.

Experimental diabetes mellitus was induced by intraperitoneal alloxan hydrate during fasting.

The investigation established that piracine exerted a stimulating effect on glucose transport in experimental diabetes. With the coordination zinc compound, there was an increase in the activity of pyruvate dehydrogenase, which is lowered in diabetes.

The findings provide again evidence for the role of zinc ions in glucose transport and oxidation.

Важность роли микроэлементов, в частности цинка, в физиологических процессах известна давно. Наряду с выполнением других функций ионы цинка могут участвовать в регуляции метаболизма глюкозы инсулином. Высказывается мнение о том, что влияние ионов цинка на метаболизм глюкозы обусловлено его воздействием не только на синтез и секрецию инсулина [9], но и на транспорт глюкозы. Обнаружено, что ионы цинка имитируют ряд эффектов инсулина: стимулируют транспорт и окисление глюкозы и ее превращение в глицериды с ингибированием липолиза [7]. Существует синергизм между инсулином и ионами цинка при стимуляции липогенеза из углеводов [3]. Установлено также, что ионы цинка повышают связывание инсулина с гепатоцитами [8]. Все эти данные указывают на то, что, кроме структурной роли в формировании запасной формы инсулина, ионы цинка причастны к механизму действия инсулина на транспорт глюкозы.

Целью настоящего исследования было изучение влияния координационного соединения цинка — пирацина на процесс поглощения глюкозы в диафрагме крыс, а также на активность пируватдегидрогеназы (ПДК) — ключевого фермента метаболизма углеводов.

Активность ПДК изучали в сердце и скелетных мышцах крыс в норме, при экспериментальном диабете, а также при действии координационного соединения цинка — пирацина.

Материалы и методы

Опыты проводили на крысах-самках массой тела 130–200 г. Экспериментальный сахарный диабет вызывали внутрибрюшинным введением аллоксана гидрата в дозе 15 мг на 100 г массы тела животных на фоне голодания в течение 24 ч.

Лечение крыс с экспериментальным сахарным диабетом проводили внутрибрюшинным введением раствора пирацина в дозе 1 мг/мл на 100 г массы тела животных. Пирацин вводили животным в течение 14 дней.

Животных декапитировали под общим эфирным наркозом. После декапитации быстро вырезали диафрагму, промывали средой инкубации, состоящей из бикарбонатного буфера Кребса—Рингера (рН 7,4), 3% бычьего сывороточного альбумина, при 0°C, помещали в сосуды Варбурга, содержащие 2 мл среды инкубации и 0,5 кБк ¹⁴C-D-глюкозы. Опыты проводили с добавлением и без добавления раствора пирацина в инкубационную среду. Инкубацию проводили в течение 120 мин при 37°C в аппарате Варбурга. Образующийся CO₂ поглощали 10% раствором КОН. По окончании инкубации через пробирку с помощью иглы в сосуды впрыскивали 0,2 мл 2 М H₂SO₄, перемешивали и оставляли на 60 мин, КОН количественно переносили во флаконы со сцинтиллятором ЖС-8. Радиоактивность определяли на счетчике "Rackbeta" (LKB, Швеция).

В митохондриях изучали активность ПДК [1].

Митохондрии выделяли из исследуемой ткани в 0,01 М фосфатном буфере с помощью дифференциального центрифугиро-