

ВЛИЯНИЕ ИНСУЛИНА И АДРЕНАЛИНА НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТОВ МЕТАБОЛИЗМА ГЛУТАТИОНА И ЕГО КОНЦЕНТРАЦИЮ В ОРГАНАХ КРЫС

Кафедры бионеорганической и биоорганической химии (зав.— проф. Л. С. Колесниченко) и биохимии (зав.— проф. В. И. Кулинский) Иркутского медицинского института

Известно, что ферменты метаболизма глутатиона (ФМГ) подвержены гормональной регуляции [4]. Так, норадреналин и изопропилнорадреналин активируют глутатионпероксидазу, глутатионтрансферазу в ряде органов, ингибируют γ -глутамилтрансферазу почек и не влияют на активность глутатионредуктазы; все эти эффекты реализуются по цепи β -адренорецепторы $\rightarrow$ аденилатциклаза $\rightarrow$ цАМФ $\rightarrow$ протеинкиназа А $\rightarrow$ фосфорилирование ФМГ [2, 3]. Влияние адреналина на эти показатели не изучалось. Исследование влияния инсулина на ФМГ представляет большой интерес, так как он действует на уровень цАМФ и его эффекты противоположны действию катехоламинов [6, 9, 10]. Однако данных о влиянии инсулина на ФМГ в литературе почти нет. Показано только, что при экспериментальном диабете активность глутатионтрансферазы в органах снижалась, а введение инсулина ее восстанавливало [8]. In vitro инсулин не влиял на активность глутатионредуктазы [11]. Задача настоящей работы заключалась в изучении влияния инсулина и адреналина на активность ФМГ и концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) в органах крыс.

Материалы и методы

Работа проведена на 130 белых крысах-самках массой 140—200 г, содержавшихся на обычной диете. Крыс наркотизировали этиналом натрия (40 мг/кг внутривенно) за 15 мин до подкожного введения гормонов в объеме 0,3 мл: R(—)-адреналина гидротартрата (Харьковский завод эндокринных препаратов) в дозе 1 мг/кг в расчете на основное (5,5 мкмоль/кг) за 15 мин до исследования и моно-

компонентного инсулина (Институт технологии кровезаместителей и гормональных препаратов, Москва) в дозе 60 мкг/кг (1,5 ед/кг) за 1—24 ч до исследования. Животных забивали обезглавливанием. В надсодочной жидкости, полученной при центрифугировании гомогенатов различных тканей при 18 000 g, определяли ФМГ, как описано ранее [3]. GSH определяли в сульфосалициловых экстрактах тканей с 5,5'-ди-тиобис-2-нитробензойном [7]. Статистический анализ проводили с использованием критериев F , t и d для несвязанных и t для связанных выборок. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Адреналин вызывает выраженную гипергликемию ($+97 \pm 8,7\%$; $p < 0,001$), а инсулин через 1 ч — выраженную гипогликемию ($-53 \pm 11\%$; $p < 0,001$). Через 3 и 5 ч эффект инсулина снижается (-35 ± 13 и $-33 \pm 13\%$; $p < 0,05$), а через 24 ч уровень глюкозы крови не отличается от нормы ($4,8 \pm 0,28$ ммоль/л; $p > 0,8$). Эти данные подтверждают адекватность выбранных доз гормонов.

Адреналин (табл. 1) активирует глутатионпероксидазу в сердце, печени и почках (на 30—36%), глутатионтрансферазу — в сердце и печени (соответственно на 148 и 37%), ингибирует γ -глутамилтрансферазу почек (на 17%) и не влияет на активность глутатионредуктазы всех исследованных органов. Это полностью совпадает с эффектами других катехоламинов [2, 3]. Адреналин увеличивает концентрацию GSH в печени, но не в других органах, что расходится с данными о снижении адреналином уровня GSH [4]. Причина этого неизвестна. Отметим, однако, что мы проводили опыты на сытых животных, т. е. в

Таблица 1
Влияние адреналина на активность ФМГ и концентрацию GSH в органах крыс

Группа	ГПО	ГТ	ГГТ	ГР	GSH
<i>Сердце</i>					
Контроль	122 $\pm$ 4,2	31,7 $\pm$ 2,3	0,72 $\pm$ 0,11	13,9 $\pm$ 1,6	1,37 $\pm$ 0,045
Опыт	161 $\pm$ 5,1 ^а	78,9 $\pm$ 6,3 ^г	0,76 $\pm$ 0,13	14,5 $\pm$ 1,7	1,33 $\pm$ 0,078
<i>Печень</i>					
Контроль	253 $\pm$ 12,7	306 $\pm$ 12,1	3,73 $\pm$ 0,45	39,3 $\pm$ 3,8	3,57 $\pm$ 0,22
Опыт	345 $\pm$ 17,4 ^а	420 $\pm$ 36,4 ^а	3,54 $\pm$ 0,56	40,4 $\pm$ 3,5	4,60 $\pm$ 0,090 ^а
<i>Почки</i>					
Контроль	135 $\pm$ 18,7	120 $\pm$ 8,9	1005 $\pm$ 85	93,8 $\pm$ 7,3	2,84 $\pm$ 0,10
Опыт	176 $\pm$ 11,7 ^б	125 $\pm$ 8,2	830 $\pm$ 44 ^б	90,3 $\pm$ 12,5	2,86 $\pm$ 0,12
<i>Головной мозг</i>					
Контроль	69,6 $\pm$ 18,0	44,4 $\pm$ 1,70	2,21 $\pm$ 0,43	14,1 $\pm$ 0,71	1,53 $\pm$ 0,061
Опыт	67,0 $\pm$ 16,5	44,8 $\pm$ 1,98	2,95 $\pm$ 0,56	13,2 $\pm$ 0,45	1,50 $\pm$ 0,051

Примечание. ГПО — глутатионпероксидаза, ГТ — глутатионтрансфераза, ГГТ — γ -глутамилтрансфераза, ГР — глутатионредуктаза. Активность ферментов выражена в нмоль/мин на 1 мг белка, концентрация GSH — в мкмоль на 1 г ткани. 3 сериях по 9—12 опытов. Здесь и в табл. 2 значимость различий с контролем: а — $p < 0,1$; б — $p < 0,05$; в — $p < 0,01$; г — $p < 0,001$.

Изменение (в %) активности ФМГ и концентрации GSH в органах крыс при введении инсулина

Срок после введения инсулина, ч	ГПО	ГТ	ГГТ	ГР	GSH
<i>Сердце</i>					
1	-19±13	+4,6±12	-23±26	+4,5±5,1	—
3	—	+5,9±17	-9,3±53	+4,5±11	—
5	—	+9,9±16	+48±62	+5,5±11	—
24	+18±43	+8,7±11	+125±108	+8,3±9,4	—
<i>Печень</i>					
1	-35±20 ^a	+3,4±8,8	+15±24	+4,9±6,5	+11±9,9
3	—	-6,7±6,6	+32±23	+8,1±9,5	+0,19±15
5	—	+11±8,7	-28±17	-1,1±7,4	+6,4±14
24	+2,1±8,4	+8,0±7,4	+6,7±28	+1,6±10	+2,7±6,3
<i>Почки</i>					
1	+11±14	-2,4±8,9	-24±9,6 ^b	-9,3±9,1	+7,2±12
3	—	-4,3±3,3	+14±18	+2,4±12	-16±6,4 ^b
5	—	-1,8±6,2	+28±22	-1,6±13	-14±4,8 ^b
24	-1,4±29	-0,45±9,4	+4,4±13	+1,8±12	-6,2±7,2
<i>Головной мозг</i>					
1	-19±6,7 ^b	+2,8±8,5	-9,0±13	+4,9±4,6	+7,1±10
3	—	+2,5±13	+29±18	-5,2±9,5	-16±14
5	—	-21±6,2 ^a	+14±17	-8,6±12	-34±16 ^b
24	+4,1±42	+28±15 ^a	+153±50 ^b	+9,8±10	-19±11 ^a
<i>Селезенка</i>					
1	-13±7,1 ^a	-4,1±7,0	-20±11 ^a	+10±7,7	+4,6±10
3	+4,7±13	+2,9±15	+19±48	+7,4±13	-10±6,7
5	+14±13	-6,5±19	-9,4±35	+5,9±19	-14±6,5 ^b
24	-1,9±26	+5,1±20	+14±25	+4,3±11	-8,0±5,8
<i>Костный мозг</i>					
1	-6,6±18	+18±12	-1,7±20	-7,3±7,1	—
3	-0,76±10	-18±15	—	+2,5±20	—
5	+3,9±12	-1,3±13	—	+1,9±17	—

Примечание. В сериях по 5—12 опытов.

условиях достаточных ресурсов аминокислот и АТФ, необходимых для синтеза GSH [4]. В головном мозге ни один из показателей не изменяется, что может быть связано с плохим проникновением адреналина через гематоэнцефалический барьер.

Инсулин (табл. 2) через 1 ч вызывает снижение или тенденцию к снижению активности глутатионпероксидазы в печени, головном мозге и селезенке, γ-глутамилтрансферазы — в почках и селезенке. Через 3 ч уменьшается концентрация GSH в почках; через 5 ч снижается активность глутатионтрансферазы в головном мозге и концентрация GSH в почках, головном мозге и селезенке. Через 24 ч в головном мозге наблюдается резкое повышение активности γ-глутамилтрансферазы и тенденция к повышению активности глутатионтрансферазы и к снижению концентрации GSH. Ни в одном органе не наблюдается изменений активности глутатионредуктазы — этот фермент не регулируется ни катехоламинами, ни инсулином.

Таким образом, инсулин не вызывает генерализованных сдвигов активности ФМГ и концентрации GSH, они отмечались лишь в некоторые сроки в отдельных органах: головном мозге,

почках и селезенке, но не печени (кроме глутатионпероксидазы через 1 ч), в сердце и костном мозге. Более того, выявленные нами изменения не совпадают с принятым — в основном по сдвигам углеводного обмена — разделением органов по чувствительности к инсулину [1]: они отсутствовали в «высокочувствительных» печени и сердце, а также в костном мозге, но выявлены в «нечувствительном» головном мозге и в «менее чувствительных» почках и селезенке. Очевидно, можно исключить предположение, что сдвиги активности ФМГ вторичны по отношению к инсулиновой гипогликемии, так как они наблюдаются лишь в отдельных органах и их проявления не соответствуют динамике содержания глюкозы крови. Это согласуется с тем, что на смену гипотезе о первичности действия инсулина на углеводный обмен (в особенности на транспорт глюкозы) [1] пришли четкие данные о самостоятельности регуляции этим гормоном различных видов обмена [6, 9, 10].

Наличие сдвигов уже через 1 ч после введения инсулина показывает, что в круг «ранних событий в действиях инсулина» [9] должны быть включены описанные изменения активности глутатионпероксидазы и γ-глутамилтрансферазы. Снижение

активности глутатионпероксидазы, противоположное влиянию катехоламинов, может быть связано с уменьшением действия системы цАМФ — протеинкиназа А. Хорошо известно, что к ранним эффектам инсулина относят снижение фосфорилирования протеинкиназой А киназы фосфорилазы, гликогенсинтетазы и триглицеридлипазы [6, 9, 10]. Однако остается непонятным, почему в отличие от широкого эффекта катехоламинов действие инсулина ограничено несколькими органами. Более того, противоположность действия инсулина и катехоламинов ограничена только глутатионпероксидазой: на глутатионтрансферазу первый в ранние сроки не влияет, а снижение активности γ -глутамилтрансферазы в почках вызывают оба гормона. Очевидно, влияния инсулина не связаны с простым противодействием эндогенным катехоламинам и являются самостоятельными.

Через 3 ч влияние инсулина почти полностью отсутствует, а через 5 ч наиболее характерное явление — снижение концентрации GSH в 3 из 4 исследованных органов. Это снижение не связано с активацией ФМГ и поэтому отражает уменьшение активности или скорее репрессию ферментов синтеза GSH. Особенностью срока 24 ч является увеличение активности γ -глутамилтрансферазы и глутатионтрансферазы в головном мозге, во всех остальных случаях изменения обмена GSH заключались только в снижении показателей. Вероятно, увеличение активности связано с индукцией этих ферментов. Хорошо известно, что инсулин вызывает индукцию (глюкокиназа, 6-фосфофрукто-1-киназа, L-пируваткиназа, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, ацетилКоАкарбоксилаза, цитратлиаза, тирозинаминотрансфераза) или репрессию (ключевые ферменты глюконеогенеза) многих ферментов [6, 9, 10].

Возможное значение тирозинкиназной активности инсулинового рецептора во всех этих сдвигах неясно, но вполне вероятно, так как ФМГ являются субстратами протеинкиназы А [2, 3], а некоторые изоферменты глутатионтрансферазы — и протеинкиназы С [12].

Таким образом, в действии инсулина на обмен GSH можно различать как ранние, так и поздние эффекты, как это известно для многих других видов обмена [6, 9, 10].

Выводы

1. Адреналин активирует глутатионпероксидазу в сердце, печени и почках и глутатионтрансферазу в сердце и печени, ингибирует γ -глутамилтрансферазу в почках и не влияет на глутатионредуктазу; в головном мозге изменений не происходит.

2. Инсулин также не влияет на активность глутатионредуктазы, не вызывает сдвигов в серд-

це, печени и костном мозге, но в головном мозге, почках и селезенке как в ранние сроки (1 ч), так и позднее (5 и 24 ч) в некоторых сериях изменяет (как правило, снижает) активность ферментов метаболизма GSH и его концентрацию.

3. Выявленные изменения не соответствуют принятому разделению органов по чувствительности к инсулину и не коррелируют с гипогликемией.

Выражаем искреннюю благодарность проф. Г. Н. Хлябичу за предоставление монокомпонентного инсулина.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кендыш И. Н. // Регуляция углеводного обмена. — М., 1985. — С. 41—75; 128—131.
2. Колесниченко Л. С., Манторова Н. С., Шапиро Л. А. // Биохимия. — 1987. — Т. 52, № 5. — С. 743—749.
3. Колесниченко Л. С., Кулинский В. И., Манторова Н. С., Шапиро Л. А. // Физиол. журн. СССР. — 1990. — Т. 76, № 10. — С. 1418—1425.
4. Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. // Успехи биол. химии. — 1990. — Т. 31. — С. 157—179.
5. Мертвецов Н. П. // Гормональная регуляция экспрессии генов / Под ред. В. И. Кулинского. — М., 1986. — С. 47—57.
6. Тенпермен Дж., Тенпермен Х. // Физиология обмена веществ и эндокринной системы: Пер. с англ. — М., 1989. — С. 458—492.
7. Anderson M. E. // Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects / Eds D. Dolphin et al. — New York, 1989. — Pt A. — P. 333—405.
8. Carnovale C. E., Monti J. A., Catania V. A., Carillo M. C. // Canad. J. Physiol. Pharmacol. — 1990. — Vol. 68, N 2. — P. 170—173.
9. Denton R. M. // Advanc. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylat. Res. — 1986. — Vol. 20. — P. 293—341.
10. Pilkis E. J., El-Mashrabi M. R. // Ann. Rev. Biochem. — 1988. — Vol. 57. — P. 755—783.
11. Shirmer R. H., Krauth-Siegel R. L. // Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects / Eds D. Dolphin et al. — New York, 1989. — Pt A. — P. 553—596.
12. Taniguchi H., Pyerin W. // Biochem. biophys. Res. Commun. — 1989. — Vol. 162, N 3. — P. 903—907.

Поступила 23.09.93

L. S. Kolesnichenko, V. I. Kulinsky, M. V. Yasko, G. A. Pensionerova, Yu. V. Grudinina — INSULIN AND ADRENALINE EFFECTS ON THE ACTIVITY AND CONCENTRATION OF GLUTATHIONE METABOLIZING ENZYMES IN RAT ORGANS

Summary. Adrenaline activates glutathione peroxidase in the heart, liver, and kidneys and glutathione transferase in the heart and liver, inhibits gamma-glutamyl transferase in the kidneys, and has no effect on glutathione reductase; no changes in the brain detected. Insulin does not influence glutathione reductase either, nor does it induce any changes in the heart, liver, and bone marrow, but it alters (as a rule reduces) in a number of cases the activities of many glutathione metabolism enzymes and reduces glutathione concentration in the brain, kidneys, and spleen both an hour and 24 h after injection. The detected changes do not conform to universally acknowledged classification of the organs by insulin sensitivity and do not correlate with hypoglycemia.