

из—кора надпочечников
стенника 5-окситрипто-
И., 1969, 142—144.
кору надпочечников.—

К. С. Действие произ-
вальной гипертензии.—

лительной системы, Л.,

ы действия серотонина,

ной функции печени у

лянюк Л. С. Влияние
рыс.— Фармакология и

from the isolated ileum
ylphenylpirazinium.—

perature of monoamines
iol., 1966, 186, 416—423.
oxytryptamine (seroto-

ydroxytryptamine dans
58.

iodicity plasma 17-hyd-

rine and serotonin and
-174.

these in vitro by sero-

n the relationship bet-

341.

Gr., Schön H. Unter-

und Leberkranken.—

liver damage.— Arch.

Надійшла до редакції

19.XI 1975 р.

OF SEROTONIN

n (0.026-0.117 mg/kg)

experiments on dogs.

intensity of its holo-

paration. Equal doses

fect than in the hypo-

after the injection of

ion was accompanied

bile composition.

УДК 612.018.2:612.015.3:612.35:028.411

М. С. Яременко, Д. А. Сутковий

ВПЛИВ ІНСУЛІНУ НА ОКИСНЕ ФОСФОРИЛЮВАННЯ ТА ВМІСТ СУЛЬФІДРИЛЬНИХ ГРУП В МІТОХОНДРІЯХ ПЕЧІНКИ ТА СЕЛЕЗІНКИ ЩУРІВ ПРИ ВВЕДЕННІ ГІДРОКОРТИЗОНУ

Відомо, що під впливом великих доз кортикостероїдів відбувається цілий ряд порушень в клітинному енергообміні. Насамперед, відзначається різке гальмування «ключових» реакцій гліколізу і ЦТК [1, 10, 11], значно зменшується активність окисно-фосфорилуючих процесів [5]. Поряд з цими змінами, в разі гіперкортицизму, в організмі людей та тварин відбувається розвиток «перехідного» стероїдного діабету. Спостерігається гіперглікемія, поліурія та глюкозурія; набувають розвитку глюконеогенні реакції [13, 17, 19]. Водночас, введення інсуліну сприяло в цих випадках відновленню нормального обміну вуглеводів. Зокрема, нормалізувався порушений гідрокортизоном процес гліколізу, різко гальмувався глюконеогенний та діабетичний ефект кортикостероїдів. Виходячи з цього була зроблена спроба з'ясувати можливість позитивного впливу інсуліну на пригнічений гідрокортизоном процес енергосинтезу. Ми досліджували окисне фосфорилування та вміст сульфідрильних груп в мітохондріях печінки та селезінки білих щурів.

Методика досліджень

Досліди провадилися на білих щурах-самцях. Тваринам I групи (контроль) ін'єкували 0,9% розчин хлориду натрію; II групи — гідрокортизон ацетат (2,5 мг на 100 г живої ваги) фірми «Ріхтер»; III групи — гідрокортизон ацетат у цій же дозі та інсулін (0,5 од. на 100 г живої ваги). Усі препарати вводили внутріочеревинно щоденно протягом двох тижнів, після чого тварин декапітували. Мітохондрії одержували на холоді з тканинних гомогенатів методом диференціального центрифугування при 10 000 g в 0,25 M трис-HCl, pH—7,4. Після виділення мітохондрії промивали та ресуспензували в 0,25 M розчині сахарози, виготовленому на 0,02 M трис-HCl. Поглинання кисню мітохондріями вимірювали на апараті Варбурга. Інкубацію проводили на протязі 20 хв при 26° С в середовищі з субстратом окислення (сукцинат) та з глюкозо-гексокіназою фосфатакцептуючою системою [5]. Газова фаза — повітря. Інтенсивність фосфорилування визначали по втратах у дослідних пробах неорганічного фосфату [12]. Вміст сульфідрильних груп визначали методом амперометричного титрування [15]. Білок вимірювали за Лоурі [16]. Кількість використаного кисню та естерифікованого фосфору обчислювали в $\mu\text{моль}$ на 1 мг мітохондріального білка, кількість SH-груп — в $\text{нмоль}/\text{мг}$ білка. Результати всіх досліджень піддавали статистичній обробці за Ст'юdentом—Фішером.

Результати досліджень та їх обговорення

З наведених у таблиці даних видно, що під впливом багаторазових введенень гідрокортизону в мітохондріях печінки та селезінки відбувається істотне зниження вмісту сульфідрильних груп та різке гальмування процесів фосфорилування. За даних умов незначних змін набувають реакції споживання кисню. Зокрема, в печінці спостерігається статистично недостовірне посилення цього процесу, в селезінці, навпаки —

зниження. Тривала дія надмірної кількості глюкокортикоїдного гормону обумовлює зменшення показника енергетичного виходу — Р/О. В мітохондріях печінки цей коефіцієнт падає на 98%, в органах селезінки він дорівнює нулю. Введення інсуліну разом з гідрокортизоном нівелиювало частково негативний ефект останнього. Як констатують дані досліджень (див. таблицю), в мітохондріях печінки спостерігається посилення естерифікації неорганічного фосфату та підвищення коефіцієнта Р/О, при цьому окисна активність органел залишалась такою ж, як і в групі тварин, яким ін'єкували лише гідрокортизон. Значні зміни відбуваються і в мітохондріях селезінки. Тут відзначається збільшення споживання кисню, активізація процесу фосфорилування та підвищення значення Р/О. Як і в мітохондріях печінки, в органах цієї тканини, під впливом інсуліну понад два рази наростає показник кількості SH-груп.

Отже, наведені дані, як і результати інших досліджень [3, 5] свідчать про те, що зміна кортикостероїдного балансу в організмі шляхом багаторазового введення надмірної кількості гідрокортизону, обумовлює значне гальмування процесів енергоутворення в клітинах печінки та селезінки. Причиною цих порушень, виходячи з даних літератури, може бути цілий ряд змін, що спостерігаються в реакціях гліколітичного перетворення глюкози, в циклі трикарбонових кислот та в системах, відповідальних за внутрімітохондріальний транспорт електронів. Так, встановлено, що у тварин, які одержували великі дози кортикостероїдів, відбувається зниження активності гексокінази, глікокінази, фосфоглюкокінази та піруваткінази [1, 8, 10]. При цьому відзначається також гальмування окислення на рівні дегідрогеназ ЦТК, порушується утворення лимонної кислоти та окислення α -кетоглютарової кислоти [9, 11], зменшується вміст НАД в мітохондріях, змінюється проникність їх мембран [2, 5].

Відповідаючи на питання, чим обумовлена негативна дія гідрокортизону на процеси окисного фосфорилування, слід також звернути увагу і на той факт, що при тривалому гіперкортицизмі в організмі тварин набуває розвитку відчутна інсулінова недостатність [13]. Відомо, що зниження вмісту інсуліну в організмі, наприклад при діабеті, супроводжується пригніченням реакцій гліколізу [1], гальмуванням перетворення лактату в піруват, малату у шавлевооцтову кислоту, гліцерину у дигідроацетон, зниження редокс-потенціалу у мітохондріальній системі НАД [14] і рівня кислот трикарбонового циклу [18]. Введення інсуліну значною мірою усуває ці порушення, каталізує реакції гліколізу та трикарбонового циклу, активує процес фосфорилування [1, 14, 18]. Аналогічний вплив інсуліну спостерігається і в наших дослідженнях. Як видно з результатів експериментів, підвищення в мітохондріях печінки та селезінки ступеня спряженості окислення з фосфорилуванням відбувається насамперед за рахунок інтенсифікації інсуліном естерифікації неорганічного фосфату. Отже, можна вважати, що відновлення порушеного гідрокортизоном процесу фосфорилування є наслідком того, що введення інсуліну, підвищуючи рівень цього гормону в організмі, сприяє тим самим нормальному перебігу реакцій, які є попередниками процесів енергоутворення. Прикладом цього припущення може бути встановлений останнім часом факт, який свідчить про те, що інсулін здатний активізувати загальмовані гідрокортизоном «ключові» ферментні реакції гліколізу [1], які, як відомо, індують акцептування фосфату від АТФ глюкозою. Встановлено, що порушення цього процесу в умовах дефіциту інсуліну приводить до роз'єднання фосфорилування з диханням і до зниження генерації АТФ [15].

Умови дослідів	Мітохондрії печінки				Мітохондрії селезінки			
	SH-групи в нмоль/мг білка		Р/О		SH-групи в нмоль/мг білка		Р/О	
	ΔO	ΔP	ΔO	ΔP	ΔO	ΔP	ΔO	ΔP
	мкатом/мг білка		мкатом/мг білка		мкатом/мг білка		мкатом/мг білка	

гивна дія гідрокор-
акож звернути ува-
в організмі тварин
[13]. Відомо, що
и діабеті, супрово-
дуванням перетво-
кислоти, гліцерину
ондріальній систе-
[8]. Введення інсу-
реакції гліколізу
вання [1, 14, 18].
их дослідженнях
мітохондріях пе-
фосфорилюванням
ісуліном естерифі-
і, що відновлення
я є наслідком то-
мона в організмі,
є попередниками
ення може бути
о те, що інсулін
«ключові» фер-
тв акцептування
ня цього процесу
фосфорилювання

рптив інсулін на окисне фосфорилування і вміст SH-груп в мітохондріях печінки та селезінки кортинізованих щурів ($M \pm m$)

Умови дослідів	Мітохондрії печінки				Мітохондрії селезінки			
	Δ0		ΔP		P/0	SH-групи в мкмоль/мг білка		
	мкмоль/мг білка		мкмоль/мг білка			Δ0	ΔP	
Контроль	1,6±0,2	2,4±0,5	1,5±0,3	77±11	1,7±0,4	1,5±0,2	1,1±0,1	90±15
Гідрокортизон	2,5±0,7	0,05±0,02	0,03±0,02	48±5	0,6±0,1	0,0	0,0	37±6
p	>0,5	<0,05	<0,05	<0,05	<0,05	—	—	<0,05
Гідрокортизон + інсулін	2,1±0,4	0,74±0,2	0,40±0,1	100±18	0,8±0,2	0,37±0,4	0,42±0,5	113±12
p	>0,5	<0,05	<0,05	>0,5	>0,5	<0,05	<0,05	>0,5
p ₁		<0,05	<0,05	<0,05	>0,5	—	—	<0,05

Примітка. р—достовірність одержаних даних у контрольній групі та у тварин, яким ін'єкували гідрокортизон або гідрокортизон разом з інсуліном; р₁—достовірність між групою тварин, які одержували гідрокортизон та гідрокортизон разом з інсуліном. Кількість досліджень для мітохондрій печінки 4-7; —сезоніки 5-6. Результати досліджень SH-груп одержані в експериментах з шестиденними гормональними навантаженнями.

З нашими даними узгоджуються відомості про те, що аналогічний інсуліну вплив може здійснювати фруктоза, яка так само, як і гормон, спроможна частково відновлювати окисне фосфорилювання в екстрактах печінки кортинізованих щурів [7].

Щодо нормалізуючої дії інсуліну на процеси фосфорилювання в печінці та селезінці можна також гадати, що спостережуваний нами ефект обумовлений частково і стимулюючим впливом цього гормону на кількісний показник сульфгідрильних груп в мітохондріях цих тканин. Останні, як відомо, є невід'ємними складовими процесів акумуляції енергії та переносу електронів від субстратів до акцепторів, а також здатні функціонувати як фактор, що зв'язує транспорт електронів, накопичення енергії та конформаційні зміни в мітохондріях [4, 6].

Література

1. Ильин В. С., Шаныгина К. И. О гормональной регуляции гексокиназной реакции в печени.— Вопросы мед. химии, 1960, 6, 3, 291.
2. Плохой В. И. и др. Влияние гидрокортизона на дыхание и фосфорилирование в митохондриях печени крыс.— Пробл. эндокринол., 1967, 13, 3, 65.
3. Подвижина Т. Т. Влияние гидрокортизона на дыхание и фосфорилирование в митохондриях мозга и печени белых крыс.— Бюлл. exper. биол. и мед., 1973, 76, 7, 40.
4. Скулачев В. П. Акумуляция энергии в клетке, М., 1969.
5. Смирнов М. И. и др. Влияние некоторых витаминов на энергетический обмен изолированных митохондрий печени крыс после отмены гидрокортизона.— Вопросы мед. химии, 1972, 18, 5, 493.
6. Торчинский Ю. М. Сульфгидрильные и дисульфгидрильные группы белков, М., 1971.
7. Шаныгина К. И. Влияние введения кортизона на окислительное фосфорилирование в экстрактах печени крыс.— Ежегодник ИЭМ АМН СССР за 1961—1962 г., Л., 1963, 273.
8. Фомина П. М., Степанова Н. Г. Влияние гидрокортизона на активность гексокиназы клеточных фракций печени у крыс и кроликов.— Ежегодник ИЭМ АМН СССР за 1961—1962 г., Л., 1963, 141.
9. Cochar K. W. et al. The influence of Certain Steroids on the Oxidation of Alfa Ketoadicids.— Endocrinol., 1954, 55, 1, 10.
10. Darshinamutri K. et al. Regulation of Rey hepatic glycolytic Enzymes.— Enzymol. Biol. et Clin., 1970, 11, 5, 423.
11. Du Bois K. P. et al. Influence of Sex Hormones on citrate Synthesis in Liver. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 1951, 78, 2, 452.
12. Fiske C. H., Subbarrou J. The colorimetric Determination of Phosphorus.— J. Biol. Chem., 1925, 66, 325.
13. Hausberger F. et al. Steroid Diabetes in Quinea Pigs.— Endocrinology, 1955, 5, 533.
14. Hohorst H. J. et al. Über die Wirkung von Insulin auf den Reduktionszustand des DPN-Systems und die Phosphorylierung der Abeninnucleotide in der Leber.— Klin. Wochenschrift., 1964, 42, 5, 245.
15. Kolthoff M. et al. Amperometric, argentimetric a. mercurimetric Titration of Sulfhydryl.— Annal. chem. Acta, 1961, 24, 280.
16. Lowry O. H. et al. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, 265.
17. Schubert C. et al. Beitrag zur Klinik des Steroiddiabetes.— Dtsch. med. Wochenschr., 1963, 88, 23, 1174.
18. Stadie W. C. Effects of Alloxan Diabetes and Insulin on Energy Metabolism.— Physiol. Rev., 1954, 34, 52.
19. Weber G. et al. Regulation of RNA Metabolism and Amino Acid Level in Hepatoms of Different Growth Rate.— In: Advances in Enzymes Reg., 1965, 3, 36, 9.

Відділ фізіології водно-сольового обміну Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР, Київ; Київський рентгено-радіологічний та онкологічний інститут

Надійшла до редакції 22.VIII 1975 р.

M.
INSULIN I
AND SU
AND SPL

The insulin was st
tive phosphorylation in
insulin and hydrocortiso
effect of the latter. In
esterification and the P
lar changes are also m
synthesis reactions are

Department of Physiol
A. A. Bogomoletz Inst
Sciences, Ukrainian SS
and Oncol

M. S. Jaremenko, D. A. Sutkovoi

INSULIN EFFECT ON OXIDATIVE PHOSPHORYLATION
AND SULPHYDRYL GROUPS CONTENT IN LIVER
AND SPLEEN MITOCHONDRIA OF CORTINIZED RATS

Summary

The insulin was studied as applied to the hydrocortisone inhibited process of oxidative phosphorylation in the liver and spleen mitochondria. A simultaneous injection of insulin and hydrocortisone for 14 days is determined to remove partially the inhibitory effect of the latter. In particular, intensification of the process of inorganic phosphorus esterification and the P/O coefficient increase are observed in the liver mitochondria. Similar changes are also marked in the spleen organellas. Here, as well as in the liver, energy synthesis reactions are intensified and the content of sulphydryl groups rises.

Department of Physiology of Water-Salt Metabolism,
A. A. Bogomoletz Institute of Physiology, Academy of
Sciences, Ukrainian SSR; Roentgenological, Radiological
and Oncological Institute, Kiev