

18. Hsu R. Y., Lardy H. A. Malic Enzyme.— In: Methods in Enzymology. New York, Acad. Press, 1969, 13, p. 230—235.
19. Kornberg A., Horecker B. L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase.— Ibid, 1955, 1, p. 323—327.
20. Ochoa S. Isocitric Dehydrogenase System (TPN) from Pig Heart.— Ibid, p. 699—704.

Киев, мед. ин-т

Поступила 11.11.82

УДК 612.015.34:611—018:616.379—008.64:616.45—001.1/3

Г. В. Валуева, В. Н. Славнов, Е. В. Лучицкий, А. А. Яковлев

СОДЕРЖАНИЕ ЦИКЛИЧЕСКИХ НУКЛЕОТИДОВ В ТКАНЯХ КРЫС В ДИНАМИКЕ ИНСУЛИНОВОЙ ГИПОГЛИКЕМИИ

Роль циклических нуклеотидов как посредников в осуществлении связи клетки с нейрогормональными регуляторными влияниями особенно четко проявляется в ситуациях, экстремальных для клетки и организма. Одним из стрессовых состояний, активирующих систему гипоталамус — гипофиз, является инсулиновая гипогликемия [2, 6, 10], при которой создаются условия, когда наряду с «основным» воздействующим фактором — инсулином, реализующим ряд эффектов через аденилатциклазную систему, накладываются воздействия других специфических для стрессорной ситуации в организме воздействий — прежде всего — АКТГ. Кортикотропин, как известно, также регулирует ряд физиологических процессов (стероидогенез, липолиз) через аденилатциклазную систему [1, 5].

Следовательно, в динамике инсулиновой гипогликемии ткани подвергаются воздействию многочисленных гормональных соединений, оказывающих прямое влияние на активность аденилатциклазной системы, что приводит к изменениям в течении некоторых биохимических реакций, лежащих в основе жизненно важных физиологических процессов.

В настоящее время, несмотря на относительно подробное изучение влияния инсулина, АКТГ *in vitro* на активность аденилатциклазной системы, практически отсутствуют данные об изменениях функции данной системы *in vivo* при условии одновременного воздействия этих гормональных факторов. В немногочисленных работах, посвященных изучению действия инсулина либо АКТГ, об активности аденилатциклазной системы судили по уровню цАМФ в крови [7, 8]. Вместе с тем уровень цАМФ в крови, отражая изменения, происходящие в пуле нуклеотида в организме, не позволяет установить источник данных колебаний, направленность их в разных тканях, механизмы, лежащие в их основе, а следовательно, объяснить нарушения ряда физиологических процессов, возникающих в условиях стрессорной реакции, и связанных с активностью аденилатциклазной системы. Это требует подробного изучения как *in vivo*, так и *in vitro* активности аденилатциклазной системы в разных тканях и содержания инсулина, АКТГ в крови в динамике развития инсулиновой гипогликемии.

Наряду с этим известно, что существует второй клеточный циклический нуклеотид — цГМФ, который выполняет столь же разнообразные функции «стратегического медиатора». Его роль в реализации эффектов инсулина, АКТГ (раздельно) изучена крайне недостаточно и практически отсутствуют работы, отражающие изменения активности гуанилатциклазной системы при одновременном воздействии инсулина и АКТГ, что наблюдается в условиях инсулиновой гипогликемии.

Цель настоящего исследования — изучить содержание цАМФ и цГМФ в печени, гипофизе, гипоталамусе, головном мозге (полушария),

эпидидимальном жире и корковом веществе надпочечников крыс-самцов в динамике инсулиновой гипогликемии, а также *in vitro* под влиянием инсулина, АКТГ.

Методика. В опытах использовали крыс-самцов, которым вводили 6 ед/кг инсулина и через 15, 30, 45, 60 и 120 мин у животных определяли уровень сахара в крови ортотолуидиновым методом и содержание цАМФ, цГМФ в исследуемых тканях и крови радиоизотопным методом наборами формы Amersham (Англия) после предварительной экстракции нуклеотидов по [13]. При исследовании *in vitro* в среду инкубации (Кребс — Рингер-фосфатный буфер, pH 7,4) помещали навески тканей и инсулин (Henning, Berlin) вводили в дозе 10 Мед в 1 мл на 100 мг ткани; АКТГ (Amersham, Англия) — 1 пг в 1 мл на 100 мг ткани. Время инкубации 3 и 10 мин, после чего в указанных тканях определяли содержание цАМФ и цГМФ.

Результаты Введение инсулина уже на 15 мин вызывает достоверное снижение (на 33 % по сравнению с исходным) уровня сахара в крови, достигающее максимума на 30 мин (на 76,2 %). К 120 мин содержание сахара в крови восстанавливается почти до его исходной

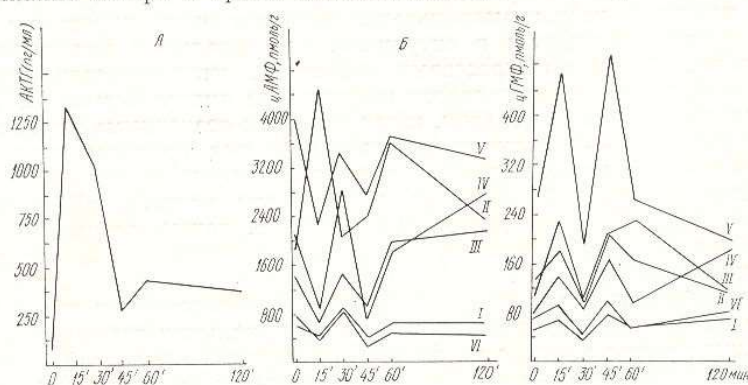


Рис. 1. Содержание АКТГ в плазме (А) и цАМФ, цГМФ в тканях (Б) крыс в динамике инсулиновой гипогликемии. I — печень; II — надпочечники; III — гипоталамус; IV — головной мозг (полушария); V — гипофиз; VI — жир.

величины. Исследование концентрации АКТГ в крови животных в разные сроки после введения инсулина показало, что на 15 мин отмечается значительное повышение количества кортикотропина в крови, которое сохраняется до 30 мин, значительно падает на 45 мин, не достигая контрольных величин, после чего содержание АКТГ остается почти на этом же уровне до 120 мин (рис. 1, А).

Изучение содержания цАМФ и цГМФ в тканях крыс в условиях инсулиновой гипогликемии позволило установить четко выраженную фазность и разнонаправленность их изменений в определенные промежутки времени после введения инсулина. Так, через 15 мин во всех тканях, кроме надпочечников (где количество цАМФ увеличивается) отмечается достоверное снижение содержания цАМФ. В этот же срок исследования концентрация цГМФ достоверно растет во всех без исключения тканях (рис. 1, Б), в том числе и в корковом веществе надпочечников. Следует обратить внимание, что в этот же промежуток наблюдается наибольшее содержание АКТГ в крови, что позволяет связать однонаправленность изменений как цАМФ, так и цГМФ за счет воздействия АКТГ — специфического регулятора физиологических процессов в органе стероидогенеза.

К 30 мин, т. е. на пике гипогликемии количество цАМФ увеличивается почти во всех тканях по сравнению с предыдущим временным промежутком, достигая контрольного уровня или превышая его. Исключение составляет адреналовая ткань, в которой содержание цАМФ

снижается по сравнению с контрольным уровнем. Исследование обратной направленности изменения концентрации цАМФ во всех тканях (по сравнению с контрольным уровнем). Наблюдается аналогичное падение (термирующееся падением) на 45 мин и на 60 мин. Исключение — адреналовая ткань (в этот же срок наблюдается повышение содержания цАМФ). Изменения в содержании цГМФ в тканях регистрируются, что позволило установить, что почти во всех тканях, кроме адреналовых, содержание цГМФ в этот же срок увеличивается. К 120 мин от содержания цГМФ в крови почти во всех тканях была почти такая же концентрация, как и в начале гипогликемии. В этот же срок содержания цГМФ по отношению к жировой ткани, головной гипогликемии концентрации (рис. 1, Б).

Таким образом, уже на 120 мин после введения инсулина наблюдаются выраженные изменения в содержании цАМФ и цГМФ в клетках различных тканей. С этим полученными данными механизм, т. е. какой из них в развитии изменений в разветвленной системе тканей инсулиновой гипогликемии, в исследованиях цАМФ и цГМФ в р

Полученные данные как влияют инсулин и разветвленной системы, реализует эффект в той или иной ткани (рис. 2, А) данных, адреналовой и жировой ткани. Содержание цАМФ в адреналовом слое надпочечников увеличивается цГМФ. Кортикотропный гормон способствует в основном в то время как содержание цАМФ несколько снижается, а содержание цГМФ повышается. Влиянием АКТГ повышается

Таким образом, при экстремальных условиях введения нуклеотидов быстро, и это позволяет, благодаря и гуанилатциклазной

снижается по сравнению с 15 мин, и достигает уровня интактных животных. Исследование содержания цГМФ в данных тканях показало обратную направленность изменений этого нуклеотида в тканях: концентрация цГМФ во всех тканях достоверно падала (в отличие от цАМФ) по сравнению с 15 мин и в ряде тканей была в пределах контрольного уровня. На 45 и 60 мин в содержании цАМФ наблюдаются аналогичные 15 и 30 мин срокам исследования изменения, характеризующиеся падением (по сравнению с предыдущим временным промежутком) на 45 мин и увеличением концентрации цАМФ в тканях на 60 мин. Исключение составляет адреналовая ткань, где в исследуемые сроки наблюдаются противоположные (по отношению к другим тканям) изменения в содержании цАМФ и его количество достоверно превышает регистрируемое у интактных крыс (рис. 1, Б). Исследования содержания цГМФ на 45 и 60 мин инсулиновой гипогликемии позволили установить четко выраженные, однонаправленные изменения почти во всех тканях, которые были противоположны изменениям уровня цАМФ в этих же тканях (рис. 2, А). В адреналовой ткани содержание цГМФ увеличивается на 45 мин и сохраняется почти на таком же уровне на 60 мин, т. е. наблюдаются однонаправленные изменения в содержании цГМФ и цАМФ в надпочечниках в эти же сроки исследования. К 120 мин от момента введения инсулина, когда уровень сахара в крови почти возвращался к исходному, а содержание АКТГ оставалось в 4 раза выше, концентрация цАМФ во всех исследованных тканях была почти такой же, как у интактных животных, за исключением гипофиза и жировой ткани, где этот показатель был несколько ниже. В этот же срок исследования отмечалось повышение содержания цГМФ по отношению к исходному уровню в гипоталамусе, печени, жировой ткани, головном мозге, в то время как в адреналовой ткани, гипофизе концентрация цГМФ была такой же, как у интактных животных (рис. 1, Б).

Таким образом, установлено, что в сроки исследования от 15 до 120 мин после введения инсулина в организме развиваются значительные изменения в содержании циклических нуклеотидов в тканях, носящие выраженный разнонаправленный характер и свидетельствующие о наличии в клетках двух контролирующих ее функции систем. Наряду с этим полученные данные не позволяют дифференцировать, какой механизм, т. е. какой из гормонов — инсулин или АКТГ, является ведущим в развитии изменений активности аденилат- или гуанилатциклазной системы тканей в динамике стрессорной реакции, обусловленной инсулиновой гипогликемией. Это послужило основанием для проведения исследований *in vitro* влияния инсулина и АКТГ на содержание цАМФ и цГМФ в разных тканях.

Полученные данные позволили в определенной степени выяснить, как влияет инсулин и АКТГ на активность аденилат- и гуанилатциклазной системы, реализуя таким образом специфический гормональный эффект в той или иной ткани. Как видно из представленных на рисунке (рис. 2, А) данных, инсулин во всех исследуемых тканях, кроме адреналовой и жировой, после 10 мин инкубации обуславливает снижение содержания цАМФ и значительное увеличение цГМФ. В корковом слое надпочечников и жировой ткани инсулин вызывает достоверное увеличение цГМФ и почти не изменяет содержание цАМФ. Адренокортикотропный гормон при инкубации с исследуемыми тканями обуславливает в основном достоверное увеличение концентрации цГМФ, в то время как содержание цАМФ остается на исходном уровне или несколько снижается (рис. 2, Б). В корковом слое надпочечников под влиянием АКТГ повышается содержание цАМФ и цГМФ (рис. 2, Б).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при экстремальных условиях (инсулиновая гипогликемия) циклические нуклеотиды быстро, но разнонаправленно реагируют на воздействие. Это позволяет, благодаря фазности изменения активности аденилат- и гуанилатциклазной систем под влиянием гормонов, постоянно под-

держивать оптимальный уровень течения ряда биохимических реакций и физиологических процессов в организме при неблагоприятных для него условиях, что следует рассматривать как мобилизацию внутренних ресурсов для обеспечения адаптации организма к патологическому воздействию.

Сопоставляя результаты проведенных *in vivo* и *in vitro* исследований, можно заключить, что реализация эффекта инсулина в разных тканях происходит, по-видимому, за счет реципрокных изменений в содержании циклических нуклеотидов.

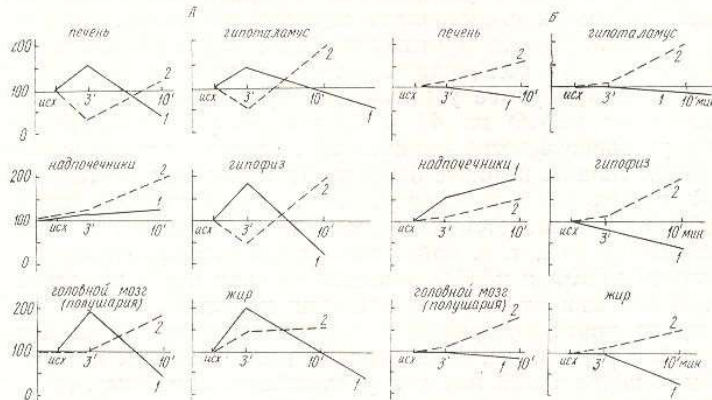


Рис. 2. Изменения содержания цАМФ (1) и цГМФ (2) в тканях крыс под действием инсулина (А) и АКТГ (Б) в % по отношению к исходному уровню.

Так, при исследовании *in vitro* на 10 мин, т. е. на пике действия инсулина, а следовательно, развития специфических биохимических процессов в тканях, регулируемых инсулином через нуклеотиды, наблюдаются разнонаправленные изменения содержания цАМФ и цГМФ. Аналогичные данные нами получены при изучении концентрации нуклеотидов в тканях крыс через 15 мин после введения инсулина. Исключение составляет адреналовая ткань, где наблюдается однонаправленность изменений в содержании нуклеотидов после введения инсулина, более выраженных при исследовании *in vivo*, чем *in vitro*.

Циклические реципрокные изменения содержания нуклеотидов в организме животных в динамике инсулиновой гипогликемии обусловлены, по-видимому, наряду с действием инсулина и другими гормональными соединениями (катехоламины), продуктами метаболизма [4, 12].

Кортикотропин в разных тканях оказывает свои специфические эффекты большей частью через гуанилатциклазную систему. В пользу этого свидетельствуют результаты исследований действия АКТГ *in vitro* на содержание цАМФ и цГМФ в тканях крыс, а также данные, полученные *in vivo* в динамике инсулиновой гипогликемии. Так, 10 мин инкубация срезов тканей с АКТГ обуславливает достоверное повышение содержания цГМФ, в то время как цАМФ остается на исходном уровне или несколько ниже. В пользу данного положения свидетельствует тот факт, что в ряде тканей на 120 мин инсулиновой гипогликемии, когда уровень сахара в крови почти нормализуется, но остается повышенной концентрация АКТГ в крови, отсутствует нормализация содержания цГМФ в некоторых тканях. К аналогичным выводам приходят и другие авторы [3, 9, 11].

Следует обратить внимание, что в адреналовой ткани так же, как при действии инсулина, адренокортикотропный гормон реализует свой специфический эффект через цАМФ и цГМФ, содержание которых *in vivo* и *in vitro* изменяется после введения АКТГ однонаправленно. Это, по-видимому, обуславливает постоянное поддержание различной ин-

тенсивности течения проц в адреналовой ткани — ст

Выводы. Под влиянием гормонов, происходят различные изменения в содержании цГМФ в тканях, что приводит к изменению уровня течения биохимических процессов в организме при

Реализация эффекта инсулина за счет реципрокных изменений

Кортикотропин оказывает свое действие преимущественно через гуанилатциклазную систему, так же как через цГМФ, так же

G. V. Valueva, V. N. S.

CONTENT OF C IN THE IN

Effect of the insulin hypoglycemia in tissues (liver, adrenals, hypothalamus, fat) was studied in experiments with insulin administration changes. They are of expressed reciprocal changes in a cell which control its

The *in vitro* studies of the effect of insulin on the content in tissues have shown that the changes in cyclic nucleotides, whereas

1. Резникова М. Б., Постников В. В. (1977). Изменения содержания нуклеотидов в тканях надпочечников. — В сб. «Гормоны и обмен веществ», стр. 123-127.
2. Besser G. M., Landon J. (1977). Effects of insulin on the levels of cyclic nucleotides in tissues of patients with Cushing's Syndrome. — *Endocrinology*, 101, 123-127.
3. Bristow A., Glud C., Fahrenholtz G. (1977). Effects of insulin on the levels of cyclic nucleotides in tissues of patients with Cushing's Syndrome. — *Endocrinology*, 101, 123-127.
4. Brown B. Role of cyclic nucleotides in Cell Function and Growth. — *Cell*, 1977, 33, 123-127.
5. Dazord A., Gallet D., L. (1977). Effects of insulin on the levels of cyclic nucleotides in tissues of patients with Cushing's Syndrome. — *Endocrinology*, 101, 123-127.
6. Donald R. A., Espiner E. (1977). Effects of insulin on the levels of cyclic nucleotides in tissues of patients with Cushing's Syndrome. — *Endocrinology*, 101, 123-127.
7. Goverde H., Pesman G., (1977). Effects of insulin on the levels of cyclic nucleotides in tissues of patients with Cushing's Syndrome. — *Endocrinology*, 101, 123-127.
8. Honn K., Chavin W. (1977). Effects of insulin on the levels of cyclic nucleotides in tissues of patients with Cushing's Syndrome. — *Endocrinology*, 101, 123-127.
9. Honn K., Chavin W. (1977). Effects of insulin on the levels of cyclic nucleotides in tissues of patients with Cushing's Syndrome. — *Endocrinology*, 101, 123-127.
10. Landon J., Wynn V. (1977). Effects of insulin on the levels of cyclic nucleotides in tissues of patients with Cushing's Syndrome. — *Endocrinology*, 101, 123-127.
11. Perchellet S., Shanker S. (1977). Effects of insulin on the levels of cyclic nucleotides in tissues of patients with Cushing's Syndrome. — *Endocrinology*, 101, 123-127.
12. Schultz G., Hardman J. (1977). Effects of insulin on the levels of cyclic nucleotides in tissues of patients with Cushing's Syndrome. — *Endocrinology*, 101, 123-127.
13. Steiner A., Pagliara A. (1977). Effects of insulin on the levels of cyclic nucleotides in tissues of patients with Cushing's Syndrome. — *Endocrinology*, 101, 123-127.

Киев ин-т. эндокринологии

тенсивности течения процессов, регулируемых АКТГ через нуклеотиды в адrenaловой ткани — стероидогенез и другие.

Выводы. Под влиянием стресса, вызванного инсулиновой гипогликемией, происходят разнонаправленные изменения содержания цАМФ и цГМФ в тканях, что позволяет постоянно поддерживать оптимальный уровень течения биохимических реакций и физиологических процессов в организме при неблагоприятных для него условиях.

Реализация эффекта инсулина в разных тканях происходит за счет реципрокных изменений содержания цАМФ и цГМФ.

Кортикотропин оказывает специфические эффекты в тканях преимущественно через гуанилатциклазную систему, а в адrenaловой ткани как через цГМФ, так и через цАМФ.

G. V. Valueva, V. N. Slavnov, E. V. Luchitsky, A. A. Yakovlev

CONTENT OF CYCLIC NUCLEOTIDES IN RAT TISSUES IN THE INSULIN HYPOGLYCEMIA DYNAMICS

Effect of the insulin hypoglycemia-induced stress on the content of cAMP, cGMP in tissues (liver, adrenals, hypophysis, hypothalamus, brain hemispheres, epididymal fat) was studied in experiments on male rats. It is established that 15-120 min after insulin administration changes in cAMP and cGMP content in tissues are observed. They are of expressed reciprocal character and evidence for the presence of two systems in a cell which control its functions.

The in vitro studies of the insulin and corticotropin effect on the nucleotide content in tissues have shown that insulin effect is realized due to reciprocal changes in cyclic nucleotides, whereas ACTH effect — mainly through guanylate cyclase system.

Список литературы

1. Резникова М. Б., Постнов Ю. В. АКТГ — аденилатциклаза в «тенях» жировых клеток у крыс со спонтанной гипертензией (особенности, выявленные при удалении надпочечников). — *Вопр. мед. химии*, 1981, 21, № 1, с. 43—46.
2. Besser G. M., Landon J. Plasma Levels of Immunoreactive Corticotrophin in Patients with Cushing's Syndrome. — *Brit. Med. J.*, 1968, 4, N 5630, p. 552—554.
3. Bristow A., Glud C., Fauchir J. et al. Effects of ACTH (corticotropin) analogues on steroidogenesis and cyclic AMP in rat adrenocortical cells. Evidence for two different steroidogenically responsive receptors. — *Biochem. J.*, 1980, 186, N 2, p. 599—603.
4. Brown B. Role of cyclic nucleotides in the anterior pituitary gland. — *Eukaryotic Cell Function and Growth*, 1976, vol. 9, p. 639—652.
5. Dazord A., Gallet D., Lacz I. Protein degradation in adrenal cells in culture is inhibited by ACTH and cyclic AMP. — *FEBS Lett.*, 1977, 83, N 2, p. 307—310.
6. Donald R. A., Espiner E. A. The Plasma Cortisol and Corticotropin Response to Hypoglycaemia Following Adrenal Steroid and ACTH Administration. — *J. Clin. Endocrinol. and Metabol.*, 1975, 41, N 1, p. 1—6.
7. Goverde H., Pesman G., Rijken J. et al. Bioactive and immunoreactive ACTH levels during insulin induced hypoglycaemia. — *Acta endocrinol.*, 1979, 91, Suppl. N 225, p. 66.
8. Honn K., Chavin W. In vitro cAMP, aldosterone and cortisol response of adult human adrenocortical tissue to ACTH and human growth hormone. — *Experientia*, 1977, 33, N 9, p. 1237—1238.
9. Honn K., Chavin W. In vitro tropic action of ACTH upon adrenocortical cyclic nucleotide (cAMP, cGMP) production and corticosterone output in blue (Prionace glauca Linnaeus) and in mako (Isurus oxyrinchus — Rubinezque) sharks. — *Gen. and Comp. Endocrinol.*, 1978, 36, N 1, p. 161—169.
10. Lardon J., Wynn V., James V. H. T. The adrenocortical response to insulin-induced hypoglycemia. — *J. Endocrinol.*, 1963, 27, N 1, p. 183—189.
11. Perchellet S., Shanker G., Lharma R. Regulatory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in adrenocorticotropin hormone-induced steroidogenesis. — *Science*, 1978, 199, N 4326, p. 311—312.
12. Schultz G., Hardman J. Possible roles of cyclic nucleotides in the regulation of smooth muscle tonus. — *Eukaryotic Cell Function and Growth*, 1976, vol. 9, p. 667—683.
13. Steiner A., Pagliara A., Lewis R. et al. Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. II. Adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate in mammalian tissue and body fluids. — *J. Biol. Chem.*, 1972, 247, N 5, p. 1114—1117.

Киев ин-т. эндокринологии и обмена веществ

Поступила 17.11.82