

А. Г. Минченко, Н. Д. Тронько

МЕТАБОЛИЗМ ^3H -ГИДРОКОРТИЗОНА В КЛЕТКАХ ПЕЧЕНИ, ПОЧЕК И СЕЛЕЗЕНКИ МОРСКИХ СВИНОК

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что глюкокортикоидные гормоны обладают многогранным действием на обмен веществ во многих органах и тканях человека и животных [2, 4, 8, 14]. Большая часть эффектов этих гормонов опосредована через изменение генной активности [1, 2, 5, 7, 11, 13, 14, 23, 24]. Вместе с тем имеется ряд данных о том, что глюкокортикоидные гормоны могут оказывать влияние на обмен веществ и на посттранскрипционном уровне [12, 15—17, 19, 21]. Проникая в клетки органов-мишеней, глюкокортикоидные гормоны связываются с цитоплазматическим рецептором и в виде активированного комплекса оказывают свое биологическое действие, а затем подвергаются метаболическим превращениям [2, 6, 20, 22]. Имеются данные о том, что в цитозоле клеток печени метаболиты глюкокортикоидных гормонов ассоциированы с рецепторными белками [22], что указывает на возможное участие цитозольных рецепторов в метаболизме этих гормонов, либо в реализации биологического действия метаболитов. Известно [6], что метаболизм глюкокортикоидных гормонов у различных видов животных имеет свои характерные особенности. И если в изучении метаболизма гидрокортизона у крыс достигнуты уже определенные успехи, то у морских свинок метаболизм этого гормона изучен недостаточно. В связи с этим в данной работе приведены результаты исследований по изучению метаболизма ^3H -гидрокортизона в цитозоле, митохондриях, ядрах и митохондриях печени, почек и селезенки морских свинок с целью выявления органных и видовых особенностей метаболизма гидрокортизона в отдельных субклеточных фракциях.

Методика. Эксперименты проводили на морских свинках-самцах, массой 280—320 г. ^3H -гидрокортизон (44 Ки/ммоль, «Amersham», Англия) вводили животным внутривенно в количестве 200 мКи/кг массы тела и морских свинок декапитировали через 10 мин после введения гормона. Печень перфузировали охлажденным до 2°C 0,9 % раствором хлорида натрия. Печень, почки и селезенку вырезали, охлаждали в 0,25 М растворе сахарозы, измельчали ножницами и гомогенизировали в гомогенизаторе с тефлоновым поршнем в среде, содержащей в 1 л 250 ммоль сахарозы, 10 ммоль трис-НСl, pH 7,4 и 25 ммоль хлорида калия. Ядра осаждали центрифугированием гомогената при 1000 g на протяжении 20 мин и очищали по [22]. Митохондрии осаждали из постядерного супернатанта при 6000 g на протяжении 20 мин и очищали, как описано ранее [10]. Микросомы и цитозол выделяли из постмитохондриального супернатанта после предварительного центрифугирования его при 20000 g на протяжении 20 мин по [22]. Гидрокортизон и его метаболиты экстрагировали из субклеточных фракций печени, почек и селезенки этилацетатом по [22]. Экстракты высушивали, растворяли в хлороформе и разделяли хроматографией в тонком слое на силуфоловых пластинках UV-254 в системе хлороформ-этанол (94:6). Для идентификации гидрокортизона и его метаболитов использовали следующие соединения: 6β -оксикортизол, гидрокортизон, кортизон, тетрагидрокортизон, тетрагидрокортизол и аллотетрагидрокортизол. Их наносили на те же хроматографические пластины, что и экстракты из субклеточных фракций, а затем профиль радиоактивности сопоставляли с положением стандартных соединений. Для определения профиля радиоактивности хроматограммы разрезали на 3 мм срезы и элюировали из них гидрокортизон и его метаболиты метанолом согласно [22], элюаты высушивали и считали в сцинтилляционной жидкости ЖС-107 в жидкостном сцинтилляционном спектрометре Mark III (Searle Anal. Inc.).

Результаты и их обсуждение. При введении интактным морским свинкам ^3H -гидрокортизона он обнаруживается во всех субклеточных фракциях печени (рис. 1). Хроматографическое разделение экстрактов из цитозола клеток печени морских свинок показало, что через 10 мин

после введения животным меченого гидрокортизона в цитозоле содержится главным образом нативный гормон (рис. 1, *a*). В небольшом количестве в этой субклеточной фракции обнаруживается кортизон и в еще меньшем количестве — тетрагидрокортизол. В отличие от цитозола в микросомах, ядрах и митохондриях клеток печени морских свинок кортизон содержится в относительно большом количестве, но основная часть обнаруживаемой на хроматограммах радиоактивности приходится на долю гидрокортизона. Следует отметить, что относитель-

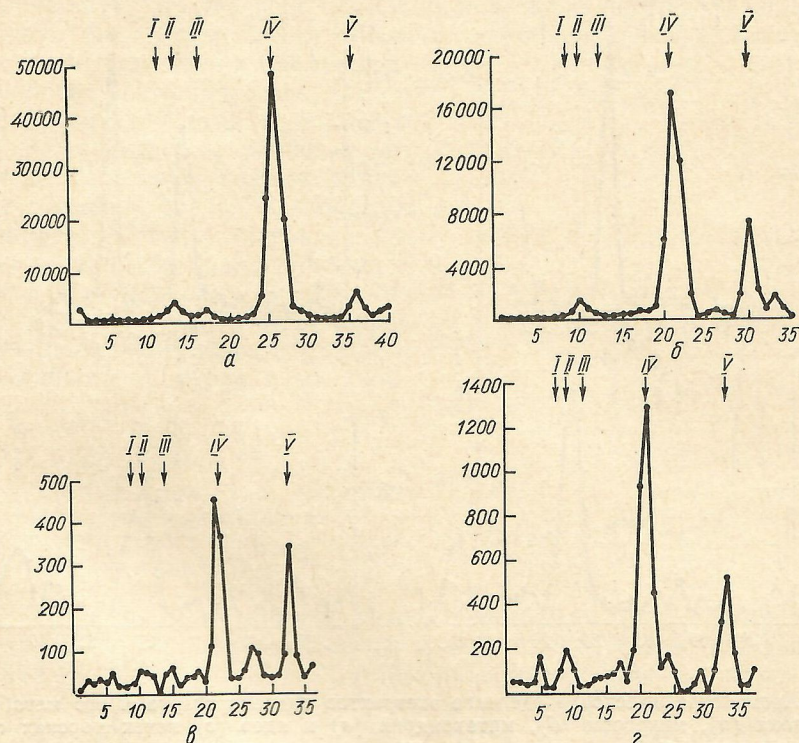


Рис. 1. Хроматографическое разделение экстрактов гидрокортизона и его метаболитов из цитозола (*a*), микросом (*б*), митохондрий (*в*) и ядер (*г*) печени морских свинок.

I — 6 β -оксикортизол, *II* — тетрагидрокортизол, *III* — аллотетрагидрокортизол, *IV* — гидрокортизон, *V* — кортизон. По горизонтали — номер фракции; по вертикали — количество радиоактивных соединений в отдельных фракциях (в расп/мин).

ное содержание кортизона в митохондриях несколько выше, чем в ядрах и микросомной фракции (рис. 1, *б*, *в*, и *г*). В очень незначительном количестве в микросомах, ядрах и митохондриях определяется тетрагидрокортизол. Низкое содержание этого метаболита в клетках печени морских свинок обусловлено, по-видимому, низкой активностью Δ^4 -редуктазы в печени этих животных [6]. Во всех субклеточных фракциях печени морских свинок нами не обнаружен 6 β -оксикортизол, который является одним из основных метаболитов гидрокортизона у морских свинок [6]. Можно предположить, что отсутствие 6 β -оксикортизола в отдельных субклеточных фракциях печени обусловлено быстрым выведением этого метаболита из клеток. Имеются данные о том, что у морских свинок гидрокортизон превращается в кортизон обратимо, а скорость необратимого превращения гидрокортизона в три раза выше скорости необратимого превращения кортизона [18]. Можно предположить, что превращение гидрокортизона в кортизон является своего рода механизмом, замедляющим необратимое превращение гидрокортизона, хотя биологический смысл такого превращения может быть более глубоким.

При хроматографическом разделении экстрактов из клеток почек морских свинок установлено, что через 10 мин после введения живот-

ным меченого гидрокортизона в цитозоле содержится главным образом гидрокортизон (рис. 2, а). Как и в печени, в цитозоле клеток почек обнаруживается в незначительном количестве кортизон и тетрагидрокортизон. В микросомной фракции клеток почек основная часть определяемой радиоактивности приходится на гидрокортизон и кортизон, но относительное содержание гидрокортизона несколько ниже, чем кортизона (рис. 2, б). Тетрагидрокортизон выявляется в микросомной

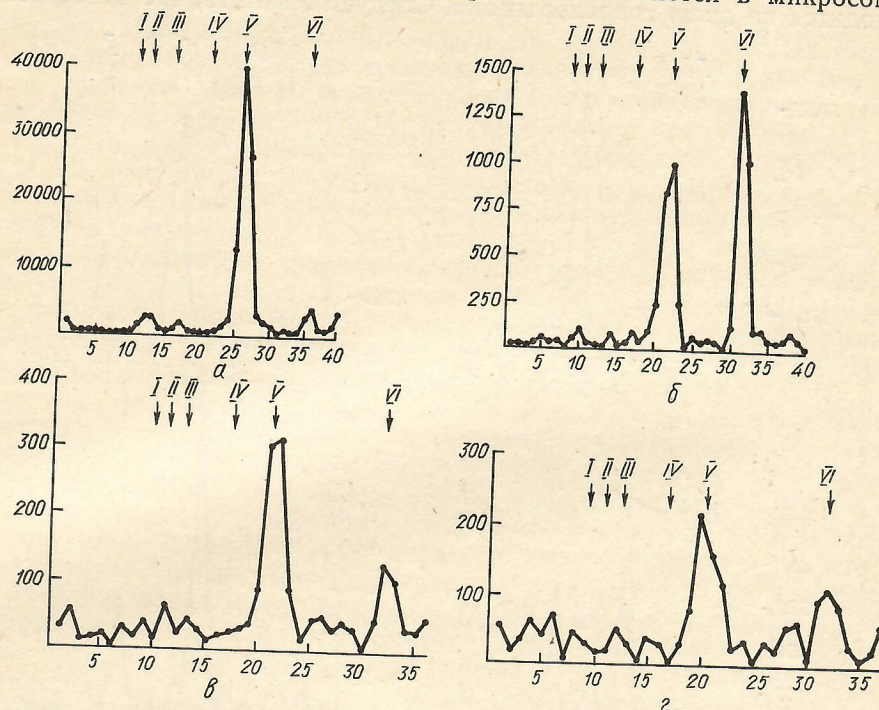


Рис. 2. Хроматографическое разделение экстрактов гидрокортизона и его метаболитов из цитозола (а), микросом (б), митохондрий (в) и ядер (г) почек морских свинок. I — 6 β -оксикортизол, II — тетрагидрокортизон, III — аллотетрагидрокортизон, IV — тетрагидрокортизон, V — гидрокортизон, VI — кортизон. Остальные обозначения см. рис. 1.

фракции в незначительном количестве. В ядрах и митохондриях клеток почек обнаруживается, главным образом, гидрокортизон и в значительно меньшем количестве кортизон (рис. 2, в и г).

Таким образом, в клетках печени и почек основным метаболитом гидрокортизона является кортизон, который обнаруживается, главным образом, в микросомной фракции, ядрах и митохондриях. Отсутствие больших количеств кортизона в цитозоле клеток печени и почек указывает на то, что образующийся, по-видимому, в ядрах, митохондриях и на мембранах эндоплазматического ретикулума кортизон, задерживается в этих структурах клеток и медленно поступает в цитозол, либо поступающий в цитозол кортизон быстро выводится из клеток. Последнее необходимо, по-видимому, чтобы исключить повторное использование поступающего из ядер, митохондрий и мембран эндоплазматического ретикулума кортизона.

В связи с тем, что действие глюкокортикоидных гормонов на процессы транскрипции и трансляции в клетках лимфоидной ткани противоположно их действию на клетки печени и почек [2, 4, 9, 14], мы провели исследования по изучению метаболизма гидрокортизона в селезенке морских свинок. Как видно из данных, приведенных на рис. 3, в цитозоле селезенки обнаруживается в большом количестве не только гидрокортизон, но и кортизон, причем относительное содержание кортизона в цитозоле селезенки значительно выше, чем гидрокортизона. Другие метаболиты в цитозоле селезенки практически отсутствуют. Таким образом, в отличие от клеток печени и почек в цитозоле

селезенки морских свинок кортизон содержится в очень больших количествах, что может быть связано со специфическим действием глюкокортикоидных гормонов на этот орган и обусловлено либо усиленным метаболизмом гидрокортизона в клетках селезенки, либо замедленным выведением кортизона из клеток.

Полученные нами данные указывают на то, что у морских свинок в клетках печени, почек и селезенки гидрокортизон превращается, главным образом, в кортизон. Другие метаболиты гидрокортизона практически отсутствуют, так как образуются в незначительном количестве или очень быстро выводятся. Наличие гидрокортизона и кортизона в ядрах и митохондриях заслуживает особого внимания, так как в этих структурах клетки содержатся гены, на экспрессию которых направлено действие глюкокортикоидных гормонов [2, 3, 25, 26]. Как гидрокортизон, так и кортизон изменяют процессы транскрипции в ядрах и митохондриях [2, 25, 26]. В связи с этим возникает вопрос о функциональной роли кортизона, образующегося в ядрах и митохон-

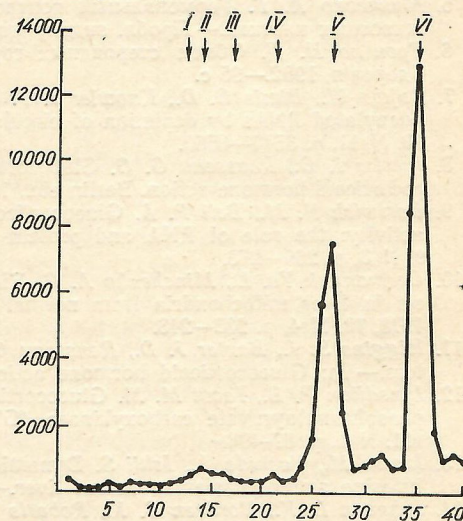


Рис. 3. Хроматографическое разделение экстрактов гидрокортизона и его метаболитов из цитозола селезенки морских свинок. Остальные обозначения см. рис. 2.

дриях клеток печени и почек морских свинок. Можно предположить, что действие кортизона на экспрессию определенных генов отличается от действия гидрокортизона. Убедительных доказательств в пользу такого предположения в настоящее время нет, хотя некоторые отличия в действии гидрокортизона и кортизона имеются [2]. Что же касается наличия кортизона в ядрах, микросомах и митохондриях клеток печени и почек, то можно предполагать, что он образуется в этих структурах клеток, а не поступает из цитозола, где он содержится в незначительном количестве.

Выводы. В клетках печени, почек и селезенки морских свинок ^3H -гидрокортизон превращается, главным образом, в кортизон.

Кортизон содержится в незначительном количестве в цитозоле клеток печени и почек и в большом — в цитозоле селезенки.

В ядрах, митохондриях и микросомной фракции клеток печени и почек кортизон содержится в относительно большом количестве.

Тетрагидрокортизол обнаружен во всех субклеточных фракциях печени в незначительном количестве.

Не выявлено существенных различий в метаболизме гидрокортизона в клетках печени и почек морских свинок.

A. G. Minchenko, N. D. Tronko

METABOLISM OF ^3H -HYDROCORTISONE IN LIVER, KIDNEY AND SPLEEN CELLS OF GUINEA PIGS

Metabolism of ^3H -hydrocortisone was studied in subcellular fractions of the guinea pig liver, kidney and spleen. Cortisone is established to be the main hydrocortisone metabolite found in liver, kidney and spleen cells. High amount of cortisone is found in spleen cytosol while cytosol of the liver and kidney contains only small amounts. At the same time nuclei, microsomes and mitochondria of the liver and kidney cells contain a rather high amount of cortisone. In all subcellular liver fractions insignificant quantities of tetrahydrocortisol are found. No essential differences in hydrocortisone metabolism are observed in the liver and kidney cells of guinea pigs.

Список литературы

1. Адлер В. В. Биохимические механизмы действия глюкокортикоидрецепторного комплекса на экспрессию структурных генов.— Вестн. АМН СССР, 1982, № 3, с. 35—42.
2. Комиссаренко В. П., Тронько Н. Д., Минченко А. Г. Современные представления о механизме действия глюкокортикоидных гормонов.— Физиол. журн., 1982, 28, № 6, с. 721—733.
3. Константинова И. М., Куличкова В. А., Воробьев В. И. Исследование особенностей РНК, синтезированной в клетках печени крыс при индукции кортизоном.— Цитология, 1977, 19, № 4, с. 398—403.
4. Кырге П. К. Молекулярные механизмы действия глюкокортикоидных гормонов.— Успехи физиол. наук, 1981, № 1, с. 56—79.
5. Минченко А. Г. Гормональный контроль экспрессии митохондриального генома в животных клетках.— Пробл. эндокринологии, 1981, 27, № 6, с. 74—79.
6. Тронько Н. Д. Обмен стероидных гормонов при эндокринной патологии.— Киев: Здоров'я, 1982.—95 с.
7. Bajwa W., Bimie G. D., Knowler J. T. Changes induced in rat liver polysomal polyadenylated RNAs by depletion of circulating glucocorticoids.— Nucl. Acids Res., 1982, 10, N 11, p. 3541—3560.
8. Baxter J. D., Rousseau G. G. Glucocorticoid hormone action: an overview.— In: Glucocorticoid hormone action. Berlin etc., 1979, p. 1—24.
9. Bortwick N. M., Bell P. A. Glucocorticoid regulation of rat thymus RNA polymerase activity: the role of RNA and protein synthesis.— Mol. and Cell. Endocrinol., 1978, 9, N 3, p. 269—278.
10. Germanyuk Ya. L., Minchenko A. G. Effect of insulin on RNA and protein biosynthesis in liver mitochondria from normal and alloxan diabetic rats.— Endocrinol. exp., 1978, 12, N 4, p. 233—243.
11. Higgins S. J., Baxter J. D., Rousseau G. G. Nuclear binding of glucocorticoid receptors.— In: Glucocorticoid hormone action. Berlin etc., 1979, p. 135—160.
12. Iynedjian P. B., Jacot M. M. Glucocorticoid-dependent induction of mRNA coding for phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in rat kidney.— Eur. J. Biochem., 1980, 111, N 1, p. 89—98.
13. Izawa M., Yoshida A., Ichii S. Dynamics of glucocorticoid receptor and induction of tyrosine aminotransferase in rat liver.— Endocrinol. jap., 1982, 29, N 2, p. 209—218.
14. Johnson L. K., Nordeen S. K., Roberts J. L., Baxter J. D. Studies on the mechanism of glucocorticoid hormone action.— In: Gene regul. steroid horm. Now York etc., 1980, p. 153—185. Discuss., p. 185—187.
15. Kanazir D. T., Trajković D. P., Ribarac-Stepić N. et al. Cortisol-dependent acute metabolic responses in rat liver cells.— J. Steroid Biochem., 1978, 9, N 5, p. 467—476.
16. Keller B. T., Landes G. M., Kitos P. A. Evidence for more than one mechanism of action of the glucocorticoid hormones.— Biochim. et biophys. acta, 1982, 717, N 2, p. 228—235.
17. Kulkarni S. B., Netrawali M. S., Pradhan D. S., Sreenivasan A. Action of hydrocortisone at a translational level in the rat liver.— Mol. and Cell. Endocrinol., 1976, 4, N 3, p. 195—203.
18. Mantin M., Tournaire C., Delost P. Measurement of the rate of secretion, peripheral metabolism and interconversion of cortisol and cortisone in adult conscious male guinea-pigs.— Steroids, 1982, 39, N 1, p. 81—85.
19. Popic S., Kanazir D. Modulation of some posttranscriptional processes in rat liver cells by cortisol.— Biochem. Soc. Trans., 1981, 9, N 2, p. 156.
20. Rousseau G. G., Baxter J. D. Glucocorticoid receptors.— In: Glucocorticoid hormone action. Berlin etc., 1979, p. 49—77.
21. Snock G. T., Voorma H. O., Wijk R. A posttranscriptional site of induction of tyrosine aminotransferase by dexamethasone in Reuber H35 hepatoma cells.— FEBS Lett., 1981, 125, N 2, p. 266—270.
22. Voigt J., Grote H., Sekeris C. E. Absence of hydrocortisone from cytoplasmic hormone protein complexes formed in vivo after administration of biologically active doses of ³H-hydrocortisone.— Biochim. et biophys. acta, 1981, 674, N 2, p. 306—318.
23. Voris B. P., Young D. A. Glucocorticoid-induced proteins in rat thymus cells.— J. Biol. Chem., 1981, 256, N 21, p. 11319—11329.
24. Young D. A., Maytin E. V., Keutman E. H. Glucocorticoid-induced proteins as initiators of rapidly-evolving metabolic hormone effects.— J. Cell. Biochem., 1982, Suppl. N 6, p. 354.
25. Yu F.-L., Feigelson P. A comparative study of RNA synthesis in rat hepatic nuclei and mitochondria under the influence of cortisone.— Biochim. et biophys. acta, 1970, 213, N 1, p. 134—141.
26. Yu F.-L., Feigelson P. A proposed model for the glucocorticoidal regulation of rat hepatic ribosomal RNA synthesis.— Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1973, 53, N 3, p. 754—760.

Киев. ин-т эндокринологии и обмена веществ

Поступила 22.09.83