EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED. XV KÖIDE
BIOLOOGILINE SEERIA. 1966, Nr. 4

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ТОМ XV
СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ. 1966, № 4

https://doi.org/10.3176/biol.1966.4.14

Л. КИЛЬДЕМА

О ВЛИЯНИИ ТИРОКСИНА НА АКТИВНОСТЬ ГЕКСОКИНАЗЫ ЭРИТРОЦИТОВ

Эритроциты, как легко изолируемые из организма клетки, наиболее пригодны для изучения влияния гормонов на клеточный обмен и прежде всего процессов гликолиза, за счет которого удовлетворяются энергетические потребности эритроцита.

По данным литературы, тиреоидные гормоны оказывают влияние на скорость гликолиза в эритроцитах. Так, Махо (Macho, 1961) доказал, что у животных после тиреоидэктомии гликолитическая активность крови уменьшается и ее можно восстановить введением тироксина. Ангелоне (Angelone, 1961) не наблюдал изменений скорости гликолиза эритроцитов у тиреоидэктомированных крыс, но при введении им тироксина с питьевой водой скорость гликолиза увеличивалась в среднем на 32%. В то же время у нормальных животных скорость гликолиза под влиянием тироксина замедлялась или оставалась без изменений. Калесник и сотрудники (Calesnick и др., 1960) показали, что через 24 часа после внутривенного введения *l*-трийодтиронина скорость гликолиза в эритроцитах возрастает, между тем как после 7—14-дневного введения этого гормона она составляет только 62% от исходного уровня.

Результаты, полученные при изучении влияния тироксина *in vitro*, показывают, что этот гормон стимулирует утилизацию глюкозы ядерными эритроцитами птиц (Winkelmann, 1963).

По вопросу влияния тиреоидных гормонов на отдельные энзиматические звенья гликолиза эритроцитов имеется относительно мало сведений. Можно указать на исследования Питканен и Никкила (Pitkänen, Nikkila, 1960), обнаруживших у больных тиреотоксикозом значительное повышение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и дегидрогеназы яблочной кислоты.

В связи с тем, что гексокиназная реакция имеет определенное значение при вовлечении глюкозы в обмен клетки и использовании ее на последующих этапах обменных превращений, интересно было проследить действие тироксина на активность гексокиназы эритроцитов как *in vitro*, так и *in vivo*.

Методика

Опыты проводили на 18 кроликах (весом 2,2—3,8 *кг*). Объектом исследований были гемолизаты эритроцитов.

Для стабилизации крови применяли гепарин. До изготовления гемолизатов эритроциты трижды отмывали в 0,9%-ном растворе хлористого натрия. Для гемо-

лиза к эритроцитам добавляли ледяную дистиллированную воду (в соотношении 1 : 2) с последующим охлаждением на льду в течение 15 *мин*.

Активность гексокиназы измеряли по убыли глюкозы в инкубационной среде. Состав инкубационной смеси: $NaHCO_3$ — 0,049М, АТФ — 0,0039М, NaF — 0,049М, $MgCl_2$ — 0,024М, глюкоза — 24 *мг%*, гемолизат эритроцитов — 1,0 *мл*. Общий объем инкубационной смеси — 2,05 *мл*, время инкубации — 60 *мин* при 37°С. Глюкозу определяли по методу Хагедорн-Иенсена. Для осаждения белков применяли $CdSO_4$. Активность гексокиназы выражали по убыли глюкозы в микрограммах на 96 *мг* гемоглобина (среднее содержание в одной пробе) (условная единица — ед.).

Для опытов применяли АТФ (препарат Ивановского мясокомбината) двух отдельных серийных выпусков. Препарат, примененный в опытах *in vivo*, показал меньшую активность. Этим, вероятно, объясняется разница в показателях убыли глюкозы, полученных в опытах *in vitro* и *in vivo*.

В работе применяли *l*-тироксин (фирма Reanal), растворенный в дистиллированной воде с прибавлением нескольких капель 0,01 н. раствора NaOH для улучшения растворимости (Angelone, 1961).

В опытах *in vitro* тироксин добавляли к инкубационной среде в концентрациях $2 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-5}$М, а в опытах *in vivo* вводили его подопытным кроликам внутримышечно из расчета 125 *мкг* на 1 *кг* веса в день. В первой серии опытов тироксин вводили лишь один раз. Активность гексокиназы определяли до и спустя 24 часа после введения его. Во второй серии тироксин вводили кроликам ежедневно в течение 20 дней. Активность гексокиназы определяли три раза: до введения тироксина, а также после пяти- и двадцатидневного введения. Кроме того, наряду с определением активности гексокиназы измеряли вес подопытных животных.

Результаты исследований

Как видно из табл. 1, тироксин *in vitro* в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-4}$ и $1 \cdot 10^{-5}$М оказывает незначительное (в среднем на 17%) тормозящее влияние на активность гексокиназы, которую, однако, не следует считать статистически существенной ($P_{dif} > 0{,}3$). Таким образом, нам не удалось показать влияние тироксина на активность гексокиназы эритроцитов в условиях *in vitro*.

Таблица 1

Активность гексокиназы эритроцитов в условиях *in vitro* при добавлении тироксина

Показатели	Контроль	Тироксин (концентрация в М)		
		$2 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-5}$
N	9	8	9	8
$M \pm m$	207 ± 18	177 ± 19	187 ± 14	194 ± 20
P	$< 0{,}01$	$< 0{,}01$	$< 0{,}01$	$< 0{,}01$
P_{dif}	—	$> 0{,}3$	$> 0{,}5$	$> 0{,}5$

N — число опытов, M — среднее арифметическое, m — средняя ошибка среднего арифметического, P — достоверность среднего арифметического, P_{dif} — достоверность разницы средних арифметических между контролем и опытом.

Спустя 24 часа после однократного внутримышечного введения тироксина кроликам активность гексокиназы эритроцитов оставалась без существенных изменений (табл. 2). Однако после длительного и многократного введения наблюдалось повышение активности фермента (табл. 3). Нарастание активности гексокиназы отмечалось уже после пятидневного введения препарата (в среднем на 22%) и к концу срока применения тироксина она продолжала повышаться (в среднем на 28%). В то же время снижение веса кроликов было соответственно: на пятый день опыта в среднем на 11, а на двадцатый — 26%.

Итак, результаты опытов *in vivo* показали, что многократное введение

Таблица 2

Активность гексокиназы эритроцитов спустя 24 часа после введения тироксина

Показатели	Контроль	Тироксин
N	9	9
$M \pm m$	150 ± 12	144 ± 10
P	$< 0{,}01$	$< 0{,}01$
P_{dif}	—	> 0.5

Таблица 3

Активность гексокиназы эритроцитов после многократного введения тироксина

Показатели	Контроль	Тироксин	
		через 5 дней	через 20 дней
N	9	9	9
$M \pm m$	166 ± 10	203 ± 13	212 ± 15
P	$< 0{,}01$	$< 0{,}01$	$< 0{,}01$
P_{dif}	—	$< 0{,}05$	$< 0{,}05$

тироксина здоровым кроликам приводит к умеренному повышению активности гексокиназы эритроцитов.

Обсуждение результатов

Данные литературы говорят о том, что тироксин при введении животному оказывает влияние на многие энзимные системы, но при добавлении этого препарата в условиях *in vitro* влияние его сказывается значительно реже (Генес, 1957; Баркер, 1964 и др.). Аналогичные результаты получены и в наших опытах, показавших, что тироксин оказывает влияние на активность гексокиназы эритроцитов только в условиях *in vivo*. При этом влияние его на активность гексокиназы наблюдалось не сразу после первой инъекции, а после неоднократного введения тироксина.

Уже в 1946 г. Гольдштейн (1959) высказал предположение, что под воздействием гормона щитовидной железы на животный организм увеличивается количество сульфгидрильных групп в ферментных белках. Стимулирующее влияние тироксина на биосинтез тиоловых ферментов в тканях наблюдали и другие авторы (Берзин, 1964). Эти данные позволяют предполагать, что тироксин или продукты его превращения в организме стимулируют гексокиназу, которая, как известно, принадлежит к группе тиоловых ферментов (Fasella, Hammes, 1963). В пользу этого говорят и ранее опубликованные в литературе данные, свидетельствующие об активизирующем гексокиназу влиянии тироксина (Smith, Williams-Ashman, цит. по Гольдштейн, 1959).

По мнению Калесника и сотрудников (Calesnick и др., 1960), изменения скорости гликолиза в эритроцитах зависят от продолжительности введения животным тиреоидных гормонов. Этот, а также ряд других факторов (например, различные дозы тироксина) могут явиться причиной несовпадения экспериментальных данных отдельных авторов (см. введение статьи). Кроме того, необходимо принимать во внимание и индивидуальные особенности животных. Например, в наших опытах повышение активности гексокиназы эритроцитов наблюдалось у всех подопытных животных, однако, индивидуальная динамика повышения активности не у всех совпадала. Так, к пятому дню введения тироксина активность гексокиназы была повышена у 8 из 9 кроликов. У одного кролика активность фермента оставалась без изменений, а после 20-дневного введения тироксина оказалась на высоком уровне (до введения тироксина — 168 ед., на 5-й день — 164 ед., а на 20-й — 200 ед.). Хотя средние показатели активности гексокиназы на 20-й день опыта были выше, чем на 5-й день, у некоторых животных активность фермента уже проявляла тенденцию к снижению.

Результаты наших исследований и данные литературы позволяют сделать вывод о том, что в условиях целостного организма гликолитические процессы в эритроцитах подчиняются регулирующему влиянию тиреоидных гормонов. Механизмы регуляции этих процессов нуждаются в дальнейших исследованиях.

Выводы

1. В условиях *in vitro* тироксин не оказывает влияния на активность гексокиназы эритроцитов у кроликов.

2. Тироксин при внутривенном введении кроликам в дозах 125 *мкг* на 1 *кг* веса тела ежедневно в течение 20 дней приводит к умеренному повышению активности гексокиназы эритроцитов.

ЛИТЕРАТУРА

Баркер С. В., 1964. Биологическое действие тироксина. В кн.: Щитовидная железа : 55—58. (Перев. с англ.). М.

Берзин Т., 1964. Биохимия гормонов : 131—142. (Перев. с нем.). М.

Генес С. Г., 1957. О механизме действия гормона щитовидной железы. Успехи соврем. биол. **64** 2(5) : 186—201.

Гольдштейн Б. И., 1959. Биохимические основы действия гормонов. В кн.: Механизм действия гормонов : 15—26. Киев.

Angelone L., 1961. The effect of the adrenal and thyroid glands on the erythrocyte glycolysis. Endocrinology **69** (5) : 896—900.

Calesnick B., Altarelli V. R., Spirtes M. A., 1960. Decrease in aerobic glycolysis of erythrocytes following the continuous administration of *l*-triiodothyronine. Endocrinology **66** (4) : 517—520.

Fasella P., Hammes G. G., 1963. Studies of the enzyme hexokinase. IV. The role of sulfhydryl groups. Arch. Biochem. and Biophys. **100** (2) : 295—297.

Macho L., 1961. The influence of hormones on the glycolytic activity of blood. Endocrinol. polska **12** (5) : 465—473.

Pitkänen E., Nikkila E. A., 1960. Erythrocyte enzymes in thyreotoxicosis. Ann. Med. Internae Fenniae **49** (3) : 197—200.

Winkelmann W., 1963. Einfluss von Schilddrüsen Hormonen auf die Glucoseaufnahme und die Atmung in Vogelerythrocyten *in vitro*. Z. Ges. Exptl Med. **136** (6) : 556—562.

Институт экспериментальной и клинической медицины Академии медицинских наук СССР

Поступила в редакцию 15/XII·1965

L. KILDEMA

TÜROKSIINI TOIMEST ERÜTROTSÜÜTIDE HEKSOKINAASI AKTIIVSUSESSE

Resümee

Uuriti türoksiini toimet küüliku erütrotsüütide heksokinaasi aktiivsusesse. Katsed tehti 18 küülikuga *in vitro* ja *in vivo*.

Heksokinaasi aktiivsust määrati glükoosi hulga vähenemise põhjal erütrotsüütide hemolüsaatide inkubeerimisel. Glükoosi määrati Hagedorni-Jenseni modifitseeritud meetodil.

l-türoksiini (firma «Reanal») kasutati *in vitro* kontsentratsioonides $2 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-4}$ ja $1 \cdot 10^{-5}$ M. *In vivo* manustati küülikutele intramuskulaarselt preparaati 125 µg/kg päevas 20 päeva jooksul.

Katsed näitasid, et *in vitro* ei avalda türoksiin ülalmärgitud kontsentratsioonides toimet erütrotsüütide heksokinaasi aktiivsusesse.

Türoksiini ühekordsel intramuskulaarsel manustamisel ei täheldatud pärast 24 tunni möödumist muutusi erütrotsüütide heksokinaasi aktiivsuses. Pärast hormoonpreparaadi korduvat süstimist ilmnes heksokinaasi aktiivsuses muutusi: 5. katsepäeval täheldati heksokinaasi aktiivsuse mõõdukat tõusu (keskmiselt 22%), mis katseperioodi lõpuks, s. o. 20. katsepäevaks, suurenes veelgi (keskmiselt 28%). (Võrreldes kontrolliga mõlema näitaja $P_{dif} < 0{,}05$.) Samal ajal oli katseloomade kehakaalu keskmine langus vastavalt 11 ja 26%.

NSV Liidu Meditsiiniteaduste Akadeemia
Eesti Eksperimentaalse ja Kliinilise Meditsiini Instituut

Saabus toimetusse
15. XII 1965

L. KILDEMA

ON THE INFLUENCE OF THYROXINE UPON THE ERYTHROCYTE HEXOKINASE ACTIVITY

Summary

The influence of thyroxine on the erythrocyte hexokinase activity of rabbits was studied. The experiments were carried out on 18 healthy animals.

The activity of enzyme in erythrocyte hemolysates was determined by the decrease of glucose in the incubation medium. The content of glucose was measured by the method of Hagedorn-Jensen, whereas the proteins were precipitated with $CdSO_4$.

l-thyroxine (firm "Reanal") was added *in vitro* to the incubation medium in concentrations $2 \cdot 10^{-4}$, $1 \cdot 10^{-4}$ and $1 \cdot 10^{-5}$ M.

At *in vivo* experiments thyroxine was given to animals intramuscularly by 125 µg per 1 kg weight daily during 20 days.

The results of experiments have shown that thyroxine added *in vitro* to hemolysates did not affect the erythrocyte hexokinase activity. One single application of thyroxine had no effect on the hexokinase activity after 24 hours. After 5 daily applications of thyroxine to rabbits there was an increase in the hexokinase activity (22%) ($P_{dif} < 0.05$), which kept rising to the end of the experimental period (28%) ($P_{dif} < 0.05$). During the same period the weight of the animals decreased by 11 and 26%, respectively.

Academy of Medical Sciences of the USSR,
Estonian Institute of Experimental and Clinical Medicine

Received
Dec. 15, 1965