

Сравнительное изучение регулирующего влияния экдистерона и ретаболила на белоксинтезирующие процессы в организме высших животных

© 2012. В. Н. Сыров¹, д.м.н., зав. лабораторией, Г. А. Шахмунова, к.б.н., доцент, З. А. Хушбактова¹, д.б.н., в.н.с., Ф. Эгамова¹, аспирант, С. О. Осипова², д.м.н., зав. лабораторией,

¹ Институт химии растительных веществ им. акад. С. Ю. Юнусова Академии наук Республики Узбекистан,

² НИИ эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний МЗ Республики Узбекистан, e-mail: kh.zainab@gmail.com

Изучены в сравнительном аспекте некоторые вопросы регуляции экдистероном (гормон линьки и метаморфоза насекомых) и ретаболилом (стероидный анаболический препарат) биосинтеза белка у млекопитающих (мыши). Показано, что белково-анаболический эффект экдистерона в организме высших животных не связан с его влиянием на синтез мРНК, а является лишь отражением ускорения трансляционных процессов. Соответствующее действие ретаболила направлено прежде всего на транскрипционные процессы с последующей генерализованной стимуляцией синтеза белковых макромолекул на цитоплазматическом уровне вследствие увеличения количества и активности полирибосом.

Comparative study of some aspects of ecdysterone (hormone of molting and metamorphosis of insects) and retabolil (steroid anabolic preparation) regulation of protein biosynthesis in mammals (mice) was carried out. Protein-anabolic effect of ecdysterone in higher animals isn't related to its influence on mRNA synthesis, but it only reflects acceleration of translation processes. Analogous effect of retabolil directs first of all to transcription processes with subsequent generalized stimulation of protein macromolecules synthesis at cytoplasmic level through augmentation of amount and activity of polyribosomes.

Ключевые слова: экдистерон, ретаболил, биосинтез белка, высшие животные

Keywords: ecdysterone, retabolil, protein biosynthesis, higher animals

В настоящее время достаточно хорошо изучено регулирующее влияние экдистероидов – гормонов линьки и метаморфоза насекомых – на белоксинтезирующие процессы в их организме, связанное в основном со стимуляцией синтеза определённых белков-ферментов на уровне транскрипции, способствующих склеротизации кутикулы личинок в процессе их превращения в куколки [1 – 4]. Однако, после установления факта влияния соединений этого класса на биосинтез белка в организме млекопитающих (по интенсивности включения ¹⁴C-аминокислот в белки органов некоторые из них не уступали 4-хлортестостерону и нероболу [5, 6]) большой интерес вызвало изучение механизма соответствующего эффекта. Это представлялось особенно важным в связи с тем, что высшие животные далеко отстоят от насекомых в эволюционном отношении. Они не способны к эндогенному продуцированию экдистероидов, и их обменные процессы в значительной степени подвержены лишь регулирующему влиянию собственной узкоспециализированной гормональной системы.

В качестве объекта исследования экдистероидов в этом плане нами был выбран экдистерон – 20-гидроксиэкдизон (экдистерон). С одной стороны, экдистерон является одним из основных (истинных) гормонов линьки и метаморфоза насекомых, с другой – он наиболее широко встречается среди экдистероидов, содержащихся в растениях (фитоэкдистероиды), и может попадать в организм высших животных и человека при использовании этих растений либо в качестве источника питания, либо в качестве создаваемых на их основе лекарственных средств и биологически активных добавок к пище, оказывающих анаболическое, адаптогенное и актопротекторное действие [7, 8]. В качестве препарата сравнения использовали известный анаболический стероидный препарат Ретаболил, близкий по строению и действию к гормону высших животных – тестостерону [9].

Материалы и методы

Экдистерон для исследований выделяли из растений *Rhaponticum integrifolium* [10]. Экди-

стерон и препарат сравнения Ретаболил вводили мышам (самцы массой 18-20 г) орально в дозах 5,0 и 10,0 мг/кг соответственно за 4 ч до начала эксперимента. В опытах с антибиотиком Д антибиотик применяли за 30 мин до введения испытуемых препаратов в дозе 2 мг/кг.

В серии опытов *in vivo* мышам за 10 мин до декапитации внутрибрюшинно вводили смесь ¹⁴C-аминокислот (лейцина и валина) по 10 мкКи на мышь, после чего печень извлекали и помещали в жидкий азот. Включение ¹⁴C-аминокислот в тотальные белки гомогената ткани печени и в завершённые полипептидные цепи полирибосом, а также радиоактивность кислоторастворимой фракции определяли по описанию [11, 12]. Время синтеза средней полипептидной цепи рассчитывали по методу [13]. Операции по выделению субклеточных компонентов печени проводили в холодной комнате при температуре 2–4 °С, необходимые растворы охлаждали до 0 °С на льду, готовили их на бидистиллированной воде. При выделении из печени мышей полирибосом, а также клеточного сока и определении их концентрации пользовались указаниями [14 – 17]. Функциональную активность полирибосом исследовали в бесклеточной системе синтеза белка по описанию [18], их седиментационный анализ проводили в линейном градиенте (10–50%) плотности сахарозы. На градиент наносили 5 мг полисом в объёме 0,5 мл и центрифугировали при 26000 об./мин в роторе SW-30 на препаративной ультрацентрифуге VAC-601 в течение 120 мин. После этого градиенты распределяли в пробирки по 20 капель, добавляли 2,0 мл воды и спектрофотометрировали при 260 нм [12]. Константы седиментации фракций полирибосом высчитывали, ориентируясь по 80S маркеру. 80S рибосомы получали при обработке полирибосом печени нормальных животных рибонуклеазой. Для этого к суспензии полирибосом (5 мг в 1 мл раствора), содержащей 0,0035 М MgCl₂, 0,055 М KCl, 0,03 М трис-HCl буфера (pH 7,6) добавляли панкреатическую рибонуклеазу фирмы «Реанал» до конечной концентрации 2 мкг/мл, инкубировали в течение 5 мин при 37 °С и охлаждали в ледяной воде, а затем наносили на градиент. Центрифугировали параллельно с опытными пробами. Соотношение «тяжёлых» и «лёгких» полирибосом печени высчитывали условно, принимая за «тяжёлые» полирибосомы фракции с константой седиментации больше 105S. Радиоактивность образцов измеряли на сцинтилляционном счётчике Марк II (фирма «Nuclear

Chicago», США). Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Проведённые эксперименты показали, что у мышей после однократного введения как экдистерона, так и ретаболила активность биосинтеза белка в печени заметно возрастает (в последнем случае этот процесс был более выраженным). Подсчёт радиоактивности общих белков гомогената печени показал, что включение в них ¹⁴C-аминокислот у опытных мышей, получавших экдистерон, было на 75,5%, а у получавших ретаболил – на 97,8% выше, чем в контроле (рис.). Концентрация меченых аминокислот во внутриклеточном фонде у контрольных животных, а также у получавших экдистерон и ретаболил, практически одинакова (радиоактивность кислоторастворимой фракции ни в одном из вариантов опыта существенно не менялась). Время же синтеза полипептидной цепи, рассчитанное на основании данных специально поставленной серии экспериментов (табл. 1), уменьшается. Всё это даёт основание предположить, что более выраженная стимуляция белкового синтеза, отмеченная нами под действием обоих стероидов в организме млекопитающих, связана с возрастанием абсолютной скорости синтеза белковых макромолекул. Однако принци-

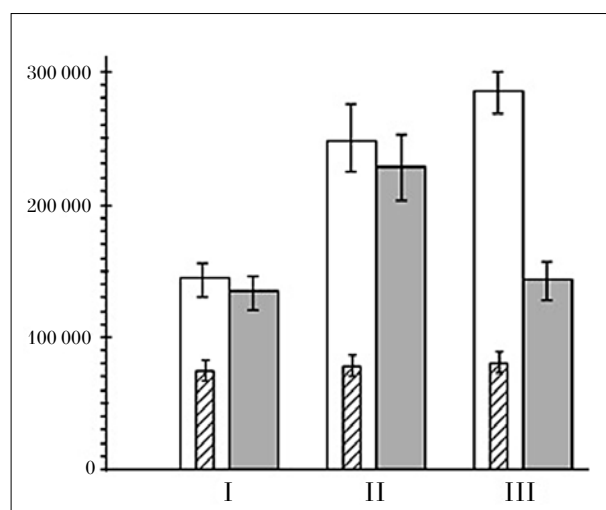


Рисунок. Радиоактивность (имп./мин./г печени) общих белков гомогената (светлые столбики – нормальные животные, тёмные столбики – предварительно обработанные актиномицином Д) и кислоторастворимой фракции (заштрихованные столбики) печени мышей в контроле (I) и после введения животным экдистерона (II) и ретаболила (III). В каждой группе было по 6–8 животных.

Таблица 1

Влияние экдистерона и ретаболила на включение меченых аминокислот в пептиды печени мышей (n = 6-8), M ± m

Условия опыта	Радиоактивность полипептидов, имп./мин./г печени			Время синтеза полипептидов, с
	тотальные	завершенные	растущие (доля, %)	
Контроль	103241 ± 1521	97002 ± 1313	6239 (0,0604)	83,83
Экдистерон	166194 ± 1766*	160765 ± 1428*	5429 (0,0327)	46,04
Ретаболил	172052 ± 1918*	168126 ± 1535*	3926 (0,0228)	32,65

Примечание: время, прошедшее с момента введения метки до момента погружения печени в жидкий азот, которое необходимо было учитывать при определении времени синтеза средней полипептидной цепи по методу [13], в каждом конкретном случае определяли по секундомеру. В наших условиях в контроле оно равнялось 660 с, у животных, получавших экдистерон и ретаболил - 670 и 682 с соответственно.

* – различия по сравнению с контролем достоверны при p < 0,05.

альным отличием между ними оказалось то, что этот процесс при введении мышам экдистерона не связан с включением новых генов и индукцией синтеза мРНК, так как предварительное введение актиномицина Д, избирательно блокирующего синтез ДНК-зависимых РНК в клетках животных [19], не устраняло выявленного эффекта стимуляции им белкового синтеза (рис.). При предварительном же введении животным актиномицина Д белково-анаболический эффект ретаболила почти полностью ингибировался (рис.).

Выявленные в этих экспериментах различия в механизме действия соединений из рассматриваемых двух классов стероидов в организме млекопитающих нашли своё продолжение и при выяснении вопроса о локализации их действия на отдельные компоненты белоксинтезирующей системы при проведении перекрёстных опытов с полирибосомами и клеточным соком от контрольных и опытных животных в системе in vitro, а также при анализе седиментационных профилей рибосомных структур из их печени в градиенте плотности сахарозы. Эффект экдистерона, в отличие от ретаболила, зависит главным образом от изменений, происходящих в полирибосомальном аппарате клеток печени (табл. 2). Его

действие на уровне факторов клеточного сока практически не проявлялось, стимулирующее же действие ретаболила на белоксинтезирующую систему гепатоцитов реализовывалось на обоих уровнях. Во-первых, это было видно при комбинации полирибосом из печени контрольных животных и клеточного сока из печени подопытных животных (наблюдалась достоверная активация реконструированной бесклеточной белоксинтезирующей системы только если тестировался ретаболил: включение ¹⁴С-аминокислот в пептиды достоверно повышалось на 11,8%). Во-вторых, добавление к полирибосомам, выделенным из печени мышей, получавших ретаболил, соответствующего же клеточного сока вносило дополнительный заметный «вклад» в активацию белкового синтеза (радиоактивность образцов повышалась на 16,4%). В серии экспериментов нами также было установлено, что повышение функциональной активности полирибосом в клетках печени животных после введения экдистерона не сопровождается существенными изменениями их распределения в градиенте плотности сахарозы. Соотношение между транслирующим и нетранслирующим материалом у подопытных и контрольных животных оставалось в пределах одних и тех же

Таблица 2

Результаты перекрёстных опытов с фракциями контрольных и опытных белоксинтезирующих систем из печени мышей (n = 9), получавших экдистерон и ретаболил в системе in vitro, M ± m

Полирибосомная фракция	Клеточный сок	Включение ¹⁴ С-аминокислот в белок, имп./мин/мг полирибосом
Контрольная (из печени интактных животных)	I. Контрольный	12822 ± 392
	II. «Экдистероновый»	13166 ± 380
	III. «Ретаболиловый»	14333 ± 436*
«Экдистероновая»	IV. Контрольный	23368 ± 165*
	V. «Экдистероновый»	24053 ± 305*
«Ретаболиловая»	VI. Контрольный	26986 ± 366*
	VII. «Ретаболиловый»	*31415 ± 502**

Примечание: * Достоверно по отношению к I (p < 0,05). ** Достоверно между VII и VI (p < 0,05).

Таблица 3

Содержание и соотношение «тяжёлых» и «лёгких» компонентов в полирибосомном материале из печени мышей, получавших экдистерон и ретаболил, %

Условия опыта	Материал		Соотношение
	«тяжёлый» (>105S)	«лёгкий» (80-105S)	
Интактные животные	82,4	17,6	4,68
Экдистерон	82,7	17,3	4,78
Ретаболил	89,8	10,2	8,80

величин. Под действием ретаболила это соотношение существенно возросло вследствие увеличения доли полирибосом (т.е. тяжёлого компонента >105S) и уменьшения содержания димеров и мономеров (табл. 3).

Полученные данные свидетельствуют о том, что усиление биосинтеза белка у млекопитающих (белково-анаболическое действие) [6] под влиянием экдистерона не определяется его влиянием на пути передачи генетической информации, как у насекомых [20]. Активация белкового синтеза в данном случае служит лишь отражением ускорения трансляционных процессов, по-видимому, за счёт сопряжённой стимуляции инициации трансляции и элонгации. В результате этого выявленное нами увеличение абсолютной скорости синтеза белка под влиянием экдистерона не сопровождается изменением полирибосомного профиля. В то же время регуляция биосинтеза белка в организме ретаболилом в первую очередь зависит от его активирующего влияния на транскрипционные процессы, усиления синтеза рибонуклеиновых кислот и прежде всего мРНК. В результате возрастает доля транслирующих рибосом и соответственно повышается их функциональная активность в бесклеточной системе белкового синтеза. Однако если бы эффект ретаболила определялся только усиленным синтезом мРНК, то с увеличением количества белковых молекул не должна была меняться абсолютная скорость их биосинтеза. Получив же в этом аспекте прямо противоположные результаты, можно с уверенностью сказать, что ретаболил, оказывая актиномицин Д-зависимую стимуляцию синтеза белка, существенно ускоряет и процессы трансляции через факторы клеточного сока. Не исключено, что в этом может принимать весомое участие транспортная РНК.

Таким образом, экдистероиды (экдистерон) принципиально отличаются по механизму стимуляции белоксинтезирующих процессов в организме млекопитающих и от присутствующего им эффекта в организме членистоногих [4, 2, 20], и от стероидных анаболических препаратов – синтетических аналогов мужских

половых гормонов. Действие экдистероидов (фитоэкдистероидов) в данном случае во многом аналогично действию других растительных веществ, в частности соединений, выделенных из женьшеня и элеутерококка [21], и не несёт никакой специфичности. Их эффекту у млекопитающих связан с воздействием на самые общие механизмы обменных процессов, которое может вести и к повышению функциональной активности полирибосом клетки. В результате активизируется синтез белков, характерных для данного организма, и только на фоне их генетически детерминированной индукции. Этим, на наш взгляд, объясняется тот факт, что при введении соединений из класса экдистероидов (фитоэкдистероидов) высшим животным наблюдается (в отличие от стеранаболов) гармоничное течение анаболических реакций в условиях целостного организма [6], адаптогенное действие [23], не сопровождаемое какими-либо специфическими гормональными эффектами и токсическими влияниями при их длительном применении [24].

Литература

1. Ахрем А.А., Левина И.С., Титов Ю.А. Экдизоны – стероидные гормоны насекомых. Минск: Наука и техника, 1973. 232 с.
2. Slama K., Romanuk M., Sorm F. Insect hormones and bioanalogues. Wien–New York: Springer-Verlag, 1974. 477 p.
3. Lafont R. Ecdysteroids and related molecules in animals and plants // Arch. Insect Biochem. Physiol. 1997. V. 35. № 1-2. P. 3–20.
4. Уфимцев К.Г., Ширшова Т.И., Володин В.В. Фитоэкдистероиды – детергенты насекомых фитофагов. Екатеринбург: 2009. 89 с.
5. Okui S., Otaka T., Uchiyama M. et al. Stimulation of protein synthesis in mouse liver by insect-moulting steroids // Chem. Pharm. Bull. 1968. V. 16. № 2. P. 384–387.
6. Сыров В.Н. Сравнительное изучение анаболической активности фитоэкдистероидов и стеранаболов в эксперименте // Хим.-фарм. журн. 2000. Т. 34. № 4. С. 31–34.
7. Володин В.В., Володина С.О., Чадин И.Ф., Мартыненко В.А. Экдистероидсодержащие растения: ре-

сурсы и биотехнологическое использование. Екатеринбург 2007. 127 с.

8. Сыров В.Н. Медикаментозные средства и биологически активные добавки на основе фитоэкдистероидов (новые подходы к фармакокоррекции нарушенных метаболических процессов в организме // VII Всероссийская конференция с молодежной научной школой: Тезисы докладов. Уфа. 2009. С. 24.

9. Машковский М.Д. Лекарственные средства. М. 2008. 1206 с.

10. Патент № IAP 03161, Республики Узбекистан. Способ получения экдистена / Н.Ш. Рамазанов, В.Н. Сыров, З. Саатов, М.Р. Рахматуллаев; № IAP 2004 0058; заявл. 24.02.2004; Расмий ахборотнома, 2006. № 5.

11. Абакумова О.Ю., Куденко Н.Г. Активность белоксинтезирующей системы и синтез РНК в печени и селезенке крыс при стрессе, вызванном ожоговой травмой // Вопр. мед. химии. 1976. № 6. С. 826–830.

12. О.Ю. Абакумова, Н.Г. Куденко, Н.Д. Ертанов и др. Влияние ускорений на активность белоксинтезирующей системы и синтез РНК в печени крыс // Космическая биол. 1973. № 5. С. 45–51.

13. Лейтин В.Л., Лерман В.И. Определение времени синтеза полипептидной цепи в опытах на животных // Биохимия. 1975. Т. 40. № 3. С. 513–520.

14. Olsnes S. Isolation of polysomes from rat liver. Contamination by membrane proteins with high affinity to ribosomes // Biochem. Biophys. Acta. 1971. V. 232. № 4. P. 705-716.

15. Ts'o P.O., Vinograd J. Ribosomes from reticulocytes // Biochem. Biophys. Acta. 1961. V. 49. P. 113–129.

16. Wannemacher R.W., Cooper W.K., Yatvin M.B. The regulation of protein synthesis in the liver of rats // Biochem. J. 1968. V. 107. № 5. P. 615–623.

17. Букринская А.Г., Жданов В.М. Субклеточные системы в вирусологии. М.: Медицина, 1973. 239 с.

18. Угарова Т.Ю., Свиткин Ю.В., Гиневская В.А., Агол В.И. Выделение и трансляция в бесклеточной системе матрично-активной РНК из цитоплазмы клеток асцитной карциномы Кребс-11 // Докл. АН СССР. Сер. Биол. 1973. Т. 211. № 4. С. 996–999.

19. Лейтин В.Л., Подобед О.В., Лерман М.И. Образование полирибосом в цитоплазме животных клеток: кинетика процесса и характеристика цитоплазматических предшественников полирибосом // Биохимия. 1972. Т. 37. № 1. С. 65–80.

20. Siegel J.G., Fristrom J.W. Effect of β -ecdysone on protein synthesis in imaginal discs of *Drosophilla melanogaster* cultured in vitro. II. Effects on synthesis in specific cell fractions // Develop. Biol. 1974. V. 41. № 2. P. 314–330.

21. Дардымов Н.В. Женьшень, элеутерококк (к механизму биологического действия). М.: Наука, 1976. 184 с.

22. Сыров В.Н. Об адаптогенных свойствах фитоэкдистероидов // Докл. АН Руз. 1996. № 11. С. 61–64.

23. Ашрафова Р.А., Сыров В.Н. Общее действие, токсичность и изменения микроструктуры внутренних органов и тканей экспериментальных животных при длительном введении экдистерона // Фармакология природных соединений. Ташкент. 1979. С. 147–153.