

у з везикул еритроцитів
цитів — 55 % початково-

в умовах гіпоксії, викли-
анемією, змінюються лі-
а. Кількісні зміни ліпідів
важливих молекулярних
в мембранах, підвищено-
ого надлишку в клітинах

CY ANEMIA ON THE MEMBRANES

cell, hepatocyte and cardiomyo-
e effect of hypoxia caused by
state of biological membranes.
branes change under conditions
ia. Quantitative changes in the
molecular mechanism of Ca^{2+}
neability producing its surplus
ices.

Влияние стеринов на свойства
://Вопр. мед. химии.— 1979.—

келеза у подростков // Терапев-
37—140.
м организме.— Алма-Ата : Нау-

в покое и во время физиоло-
анемией // Клин. медицина.—

ть ПАМФ-зависимого фосфори-
имой миокарда // Биохимия.—

толиклиническое лечение боль-
и трансфузиология.— 1985.—

— К.: Виц. шк., 1985.— С. 346.
я.— 1984.— № 12.— С. 52—55.
2. 257—290.

И. Лепилина Л. А. Состояние
ными анемиями // Лаб. дело.—

Г. Железодефицитные состоя-

за.— Л.: Наука, 1982.— 224 с.
esterified fatty acids in plas-

rosclerosis / Ishikawa Y., Muko-
genes: Proc. Int. Symp., Niogo,

mbraanes from cardial muscle //

ation of phosphorus // J. Biol.

e method for the isolation and
id.— 1957.— 226.— P. 497—509.

Матеріал надійшов
до редакції 13.08.91

УДК 594.124[262.5]

Фан Ван Ты, С. А. Петров, А. Я. Розанов

Взаємодія ліпосової кислоти та її метаболітів з аспартат- і аланінамінотрансферазою у мультиензимному комплексі мітохондрій печінки і мозку щурів

*Показано, что липоевая кислота и липоамид эффективно ингибируют аспартат- и аланинаминотрансферазу в митохондриях печени и мозга крыс. Указанный эффект еще более выражен для очищенного мульти-
ензимного комплекса — метаболона.*

Вступ

Сучасна ензимологія висунула на одне з перших місць вивчення взаємодії окремих ферментів і коферментів у мультиензимних комплексах, одним з яких є метаболон, описаний Robinson і Srere [13, 14]. До його складу входять ферменти циклу трикарбонових кислот, трансамінази і деякі інші ферменти [2, 3, 14]. Взаємодії окремих ферментів і коферментів у метаболоні різноманітні і майже зовсім не досліджені [5, 7, 8]. У цьому мультиензимному комплексі є фермент, який займає центральне положення — це α -кетоглутаратдегідрогеназа [2], яка сама є мультиензимним комплексом [6, 16]. Серед коферментів, які входять до її складу, значне місце займає міцно зв'язана ліпоева кислота. Цей кофермент разом з коензимом А лімітує α -кетоглутаратдегідрогеназну реакцію [11, 15, 16]. Трансамінази, які є складовою частиною метаболона, виконують важливу функцію поповнення фонду α -кетокислот — субстратів деяких ферментів циклу Кребса. Ці ферменти регулюються різними речовинами, серед яких значне місце належить вітамінам і їх метаболітам [9—11].

В зв'язку з цим мета нашої роботи — вивчити вплив ліпосової кислоти і її метаболітів (ліпоаміда і 4,6-дітіогексанової кислоти) на активність аспартат- і аланінамінотрансферази (АсТ і АлТ відповідно) метаболона мітохондрій печінки та мозку щурів.

Методика

В дослідах ми використовували щурів лінії Вістар масою 180—200 г. Метаболон виділяли з мітохондрій печінки і мозку по методу Robinson і Srere [13]. Для виділення мітохондрій ми користувалися слідуючим середовищем виділення: 220 ммоль/л манітола, 70 ммоль/л сахарози, 2 ммоль/л HEPES-KOH (pH 7,0).

Печінку і мозок гомогенізували на цім середовищі у співвідношенні 1 г тканини на 9 мл середовища. Гомогенати центрифугували на рефрежераторній центрифугі ЦЛР при 700 г на протязі 5 хв. Осад, який містив ядра і уламки клітин, відкидували. Супернатант повторно центрифугували при 12 000 г на протязі 10 хв. Отримані мітохондрії ресуспендували у середовищі виділення в співвідношенні: 10—20 мг білка на 1 мл середовища. Суспензію обробляли ультразвуком на ультразвуковому диспергаторі УЗДН-2т з використанням універсального випромінювача з кінцевою насадкою, яка давала частоту випромінювання 22 кГц. Суспензію оброблених мітохондрій центрифугували на ультрацентрифугі WAC-602 з використанням вуглового ротора при 32 000 г на протязі 30 хв. Отриманий осад ресуспендували в HEPES-середовищі при pH 7,0 і застосовували для досліджень.

Активність АсТ і АлТ визначали 2,4-динітрофенілгідразиним методом [3]. Для визначення впливу пірідоксальфосфата (ПАЛФ), ліпосової кислоти, ліпоаміда і 4,6-дітіогексанової кислоти на активність

© ФАН ВАН ТЫ, С. А. ПЕТРОВ, А. Я. РОЗАНОВ, 1992

АсТ і АлТ в інкубаційне середовище вносили еквімолярну кількість цих речовин. Білок визначали за методом Lowry і співавт. [12].

Отримані результати обробляли статистичними методами [1, 4].

Результати і їх обговорення

Поперед усім ми вивчили вплив ліпоевої кислоти і її метаболітів на активність АсТ і АлТ в мітохондріях печінки і мозку щурів. При аналізі результатів, представлених у табл. 1, поперед усе звертає на себе увагу, що в мітохондріях печінки і мітохондріях мозку активність АсТ на порядок вище, ніж активність АлТ. Додавання в середовище інкубації кофермента трансаміназ — ПАЛФ призводить до активації АсТ і АлТ приблизно на 50 %. Певно, в мітохондріях є деяка кількість вільних апотрансаміназ, які набувають функціональної активності в присутності цього кофермента. Крім того, дані табл. 1 свідчать про те, що рівень активності АсТ в мітохондріях печінки перевищує аналогічний показник в мітохондріях мозку. Для АлТ такої закономірності не встановлено.

В більшості випадків ліпоева кислота і її амід чинили інгібіруючий вплив на активність АсТ і АлТ в печінці і мозку. Цей ефект спостерігався в більшій мірі для ферментів реактивованих ПАЛФ, ніж у випадку відсутності ПАЛФ в інкубаційному середовищі. 4,6-Дітіогексанова кислота характеризувалася інгібіруючою дією тільки для АсТ мітохондрій мозку і печінки і тільки при наявності в середовищі ПАЛФ. Порівнюючи інгібіторні ефекти ліпоевої кислоти і ліпоаміда у відношенні трансаміназ печінки і мозку, треба відмітити, що в мітохондріях печінки майже в усіх варіантах більш міцним інгібітором була ліпоева кислота, а в мітохондріях мозку — ліпоамід. Ці особливос-

Таблиця 1. Активність аспартат- і аланінамінотрансферази (АсТ і АлТ відповідно) під впливом ліпоевої кислоти і її метаболітів в мітохондріях печінки і мозку щурів ($M \pm m$), мкмоль/л пірувата $\cdot$ мг $^{-1}$ білка $\cdot$ хв $^{-1}$

Фермент	Без пірідоксальфосфату в інкубаційному середовищі			
	Контроль	Ліпоева кислота	Ліпоамід	4, 6-Дітіогексанова кислота
Мітохондрії печінки				
АсТ	0,2822 $\pm$ 0,0228	0,2662 $\pm$ 0,0247 P<0,05	0,2717 $\pm$ 0,0183 P<0,05	0,2697 $\pm$ 0,0270 P>0,05
АлТ	0,0239 $\pm$ 0,0026	0,0222 $\pm$ 0,0026 P<0,05	0,0239 $\pm$ 0,0024 P>0,05	0,0240 $\pm$ 0,0025 P>0,05
Мітохондрії мозку				
АсТ	0,2120 $\pm$ 0,0026	0,1830 $\pm$ 0,0278 P<0,01	0,1822 $\pm$ 0,0293 P<0,02	0,1888 $\pm$ 0,0307 P<0,02
АлТ	0,0238 $\pm$ 0,0017	0,0222 $\pm$ 0,0020 P<0,05	0,0198 $\pm$ 0,0019 P<0,01	0,0217 $\pm$ 0,0023 P<0,02
Фермент	З пірідоксальфосфатом в інкубаційному середовищі			
	Контроль	Ліпоева кислота	Ліпоамід	4, 6-Дітіогексанова кислота
Мітохондрії печінки				
АсТ	0,4265 $\pm$ 0,0245	0,3860 $\pm$ 0,0217 P<0,05	0,3072 $\pm$ 0,0223 P<0,02	0,3821 $\pm$ 0,0257 P<0,05
АлТ	0,0356 $\pm$ 0,0032	0,0312 $\pm$ 0,0029 P<0,05	0,0326 $\pm$ 0,0031 P<0,05	0,0346 $\pm$ 0,0031 P>0,05
Мітохондрії мозку				
АсТ	0,3626 $\pm$ 0,0200	0,3401 $\pm$ 0,0274 P<0,03	0,3173 $\pm$ 0,0180 P<0,05	0,3361 $\pm$ 0,0232 P<0,05
АлТ	0,0362 $\pm$ 0,0022	0,0347 $\pm$ 0,0020 P<0,02	0,0344 $\pm$ 0,0020 P<0,05	0,0342 $\pm$ 0,0018 P<0,02

ті можуть бути пов'язані з впливом ліпоевої кислоти і її метаболітів на активність метаболітів (табл. 2). Зокрема, як і в мітохондріях печінки, так і в мітохондріях мозку, активність АлТ. Крім того, на відміну від АсТ, характеризують метаболіти, отримані з мітохондрій, ліпоева кислота, як і дві інші метаболіти, не встановлено.

Таблиця 2. Активність метаболітів, виділених з мітохондрій, ліпоевої кислоти і її метаболітів

Субстрат	Активність
Метаболон, виділений з печінки	0,3
Метаболон, виділений з мозку	0,1
Субстрат	
Метаболон, виділений з печінки	0,0
Метаболон, виділений з мозку	0,0

Таким чином, внаслідок впливу ліпоевої кислоти і її метаболітів на активність метаболітів, можна сказати, що метаболіти проявляються в мітохондріях як інгібітори.

Phan Van Chi, S. A. Petre

THE INTERACTIONS OF THE ASPARTATE- AND ALANINE-AMINOTRANSFERASES EXTRACTED FROM LIVER

It is shown that lipoic acid can interact and inhibit the activity of these enzymes. This effect is much more pronounced in the case of aspartate-aminotransferase than in the case of alanine-aminotransferase.

I. I. Mechnikov State University of Higher and Secondary Education of the Ukraine, Odessa

или еквімолярну кількість lowgu і співавт. [12]. тичними методами [1, 4].

кислоти і її метаболітів на и і мозку шурів. При ана- поперед усе звертає на се- ондріях мозку активність . Додавання в середовище призводить до активації ондріях є деяка кількість нціональної активності в дані табл. 1 свідчать про ах печінки перевищує ана- ля АлТ такої закономірно-

її амід чинили інгібірую- ці і мозку. Цей ефект спо- активованих ПАЛФ, ніж у у середовищі. 4,6-Дітіоек- очую дією тільки для АсТ наявності в середовищі евої кислоти і ліпоаміда у еба відмітити, що в міто- ьш міцним інгібітором бу- — ліпоамід. Ці особливос-

сферизи (АсТ і АлТ відповідно) ондріях печінки і мозку шурів

в шийному середовищі

Ліпоамід	4, 6-Дітіоексанова кислота
$17 \pm 0,0183$ $P < 0,05$	$0,2697 \pm 0,0270$ $P > 0,05$
$39 \pm 0,0024$ $P > 0,05$	$0,0240 \pm 0,0025$ $P > 0,05$
$22 \pm 0,0293$ $P < 0,02$	$0,1888 \pm 0,0307$ $P < 0,02$
$98 \pm 0,0019$ $P < 0,01$	$0,0217 \pm 0,0023$ $P < 0,02$

в шийному середовищі

Ліпоамід	4, 6-Дітіоексанова кислота
$72 \pm 0,0223$ $P < 0,02$	$0,3821 \pm 0,0257$ $P < 0,05$
$26 \pm 0,0031$ $P < 0,05$	$0,0346 \pm 0,0031$ $P > 0,05$
$73 \pm 0,0180$ $P < 0,05$	$0,3361 \pm 0,0232$ $P < 0,05$
$44 \pm 0,0020$ $P < 0,05$	$0,0342 \pm 0,0018$ $P < 0,02$

ті можуть бути пов'язані з різницею вмісту самого вітаміна і його амі- да в мозку і печінці.

Отримавши описані вище результати, ми вирішили вивчити вплив ліпоевої кислоти, її аміда і 4,6-дітіоексанової кислоти на трансаміназ- ну активність метаболону, виділеного з мітохондрій печінки і мозку шурів (табл. 2). З результатів, представлених в табл. 2, видно, що так як і в мітохондріях, в метаболонах активність АсТ істотно перевищує активність АлТ. Крім того, метаболони, виділені з мітохондрій печін- ки, характеризуються більшою активністю АлТ і особливо, АсТ, ніж метаболони, отримані з мітохондрій мозку. Також як і в дослідях з мітохондріями, ліпоева кислота і її метаболіти інгібували АсТ і АлТ. Однак інгібіторний ефект в разі метаболітів був більш виразним. Крім того, на відміну від мітохондрій, у метаболоні 4,6-дітіоексанова кислота, як і дві інші досліджені сполуки, виявляли інгібіруючі влас- тивості. Для метаболонів, виділених з мітохондрій печінки, по інгі- біторному ефекту досліджені сполуки можна розташувати наступним чином: 4,6-дітіоексанова кислота > ліпоамід > ліпоева кислота. Для метаболонів, виділених з мітохондрій мозку, такої чіткої закономірно- сті не встановлено.

Таблиця 2. Активність аспартат- і аланінамінотрансферази (АсТ і АлТ відповідно) метаболонів, виділених з печінки і мозку шурів ($M \pm m$, $n=9-10$), під впливом ліпоевої кислоти і її метаболітів (мкмоль пірвата $\cdot$ мг $^{-1}$ білка $\cdot$ хв $^{-1}$)

Субстрат	АсТ			
	Контроль	Ліпоева кислота	Ліпоамід	4, 6-Дітіоексанова кислота
Метаболон, виді- лений з печінки	$0,3671 \pm 0,0416$ —	$0,2954 \pm 0,0252$ $P < 0,05$	$0,2828 \pm 0,0193$ $P < 0,01$	$0,2601 \pm 0,0497$ $P > 0,05$
Метаболон, виді- лений з мозку	$0,1528 \pm 0,0058$ —	$0,1298 \pm 0,0033$ $P < 0,02$	$0,1348 \pm 0,0050$ $P < 0,05$	$0,1349 \pm 0,0052$ $P < 0,05$

Субстрат	АлТ			
	Контроль	Ліпоева кислота	Ліпоамід	4, 6-Дітіоексанова кислота
Метаболон, виді- лений з печінки	$0,0264 \pm 0,0015$ —	$0,0239 \pm 0,0014$ $P < 0,02$	$0,0222 \pm 0,0013$ $P < 0,02$	$0,0217 \pm 0,0013$ $P < 0,01$
Метаболон, виді- лений з мозку	$0,0224 \pm 0,0008$ —	$0,0206 \pm 0,0007$ $P < 0,01$	$0,0185 \pm 0,0013$ $P < 0,01$	$0,0202 \pm 0,0010$ $P < 0,01$

Таким чином, всі приведені результати свідчать про те, що ліпое- ва кислота і її метаболіти — ліпоамід і 4,6-дітіоексанова кислота є інгібіторами мітохондріальних трансаміназ. Цей ефект в найбільшій мірі проявляється на мультиензимних комплексах — метаболонах, при- сутніх в мітохондріях.

Phan Van Chi, S. A. Petrov, A. Ya. Rosanov

THE INTERACTIONS OF LIPOIC ACID AND ITS METABOLITES WITH THE ASPARTATE- AND ALANINEAMINOTRANSFERASE OF METABOLON EXTRACTED FROM LIVER AND BRAIN MITOCHONDRIA

It is shown that lipoic acid and its metabolites — lipoamide and 4,6-dithiohexanoic acid can interact and inhibit the mitochondrial aspartate- and alanineaminotransferase activities. This effect is much more pronounced in the case of multienzyme complexes — metabolon.

I. I. Mechnikov State University,
Ministry of Higher and Secondary Special Education
of the Ukraine, Odessa

1. Вознесенский В. Л. Первичная обработка экспериментальных данных.— Л.: Наука, 1969.— 198 с.
2. Любарев А. Е., Курганов Е. И. Надмолекулярная организация ферментов цикла трикарбоновых кислот // Мол. биология.— 1987.— 21, № 5.— С. 1286—1296.
3. Осадная Л. М. Определение активности аминотрансфераз в тканях. // Методы биохим. исследований.— Л.: Изд-во Ленинград. ун-та, 1982.— С. 246—250.
4. Рокицкий М. Ф. Биологическая статистика.— Минск.: Высшая школа, 1972.— 201 с.
5. Фридрих П. Ферменты: четвертичная структура и надмолекулярные комплексы.— М.: Мир, 1986.— С. 160—165.
6. Фридрих П. Ферменты.— М.: Мир, 1986.— С. 128—135.
7. Beeckmans S., Kanarek L. Demonstration of physical interactions between consecutive enzymes of the citric acid cycle and of the aspartate—malate shuttle. A study involving fumarate, malate dehydrogenase, cytrate synthase and aspartate aminotransferase // Eur. J. Biochem.— 1981.— 117.— P. 527—555.
8. Beeckmans S., Kanarek L. Enzyme-enzyme interactions as modulators of the metabolic flux through the citric acid cycle // Krebs Cycle of citric acid—Half Century and still turn: Symp. Leicester, Apr., 1987.— London.— 1987.— С. 163—172.
9. Cate R. L., Roshe T. E. A unifying mechanism for stimulation of mammalian pyruvate dehydrogenase kinase by reduced nicotinamide adenine dinucleotide, dihydroli-poamide, acetylcoenzyme A or pyruvate // J. Biol. Chem.— 1973.— 253.— P. 496—503.
10. Cate R. L., Roche T. E. Function and regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex // Ibid.— 1979.— 254.— P. 1659—1665.
11. Lai J. C. K., Cooper A. J. L. Brain α -ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties, regional distribution and effect of inhibitors // J. Neurochem.— 1986.— 47, N 5.— P. 1576—1586.
12. Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.— 1951.— 193.— P. 265—275.
13. Robinson J., Srere P. A. Organization of Krebs tricarboxylic acid cycle enzymes in mitochondria // Ibid.— 1985.— 260, N 19.— P. 10800—10805.
14. Robinson J., Inman L., Sumegi B., Srere P. A. Further characterization of the Krebs tricarboxylic acid cycle metabolon // Ibid.— 1987.— 262, N 4.— P. 1786—1790.
15. Tanaka N., Koike K., Namada M. et al. Mammalian α -keto acid dehydrogenase complexes. VII. Resolution and reconstitution of the pig heart 2-oxoglutarate dehydrogenase complex // Ibid.— 1972.— 247, N 12.— P. 4043—4049.
16. Tanaka N., Koike K., Otsuka K. I. et al. Mammalian α -keto acid dehydrogenase complex. VIII. Properties and subunit composition of the pig heart lipoate succinyl transferase // Ibid.— 1974.— 149, N 1.— P. 191—198.

Одес. ун-т ім. І. І. Мечникова
М-ва вищ. і серед. освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 02.10.89

УДК 612.73:615.327:577.15

М. С. Яременко, И. А. Бутусова

Гастрининкреторные эффекты солевых компонентов воды нафтуса

У дослідів на щурах показано, що розчини окремих солевих компонентів мінеральної води нафтусі, введені інтрагастрально, у мінімальних концентраціях (1—5 ммоль/л), здібні змінювати інтенсивність і спрямованість гастринемічної реакції порівняно з контролем. Однозначність дії тої чи іншої групи солей визначається насамперед їх аніонним, а не катіонним складом. Хлоридні солі Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} гальмують, а сульфатні (у поєднанні з тими ж катіонами) — стимулюють гастринемію. Ефект гідрокарбонатних солей двофазний: спочатку (при нейтралізації шлункової кислоти) відбувається незначне зниження концентрації гормону в крові, потім — підвищення. Катіони Mg^{2+} і Ca^{2+} здібні значно модулювати викликану аніонами реакцію. Інтенсивність гастринемічних реакцій залежить від вихідної концентрації гастрину в крові — ефект іонної стимуляції більш виражений при низькому її вихідному значенні, і навпаки.

© М. С. ЯРЕМЕНКО, И. А. БУТУСОВА, 1992

Введение

Ранее нами было показано, что гидрокарбонатная каловая органические вещества, действием [1, 3, 4]. Печеский эффект обусловлен действием органических веществ, которая активность последующая активность последующая оспаривалась [2], одна введение искусственного более высокую гипергастрии воды [1]. Устранение изотонического раствора гипергастринемического комплекса минеральных веществ обладает самостоятельным из этого, представляло отдельных ионов (в концентрации — 1—5 ммоль/л) спонтанная гастрин в крови.

Методика

Опыты проведены на крысах в течение суток при свободном доступе к пище и воде. Внутригастрально (0,5 % растворы: ИСАН — состав: Na^+ (1 ммоль/л), Cl^- (5 ммоль/л). Концентрация содержимого в натрии использовали дистиллированную воду 5 и 30 мин (время, соответствующее времени в двухфазной гипергастринемии брали кровь, отделяли осадок гастрин (пг/мл) радионуклидами «Sorgin» (Франция).

Результаты обработки

Результаты и их обсуждение

Введение крысам в желудок через 5 мин вызывает повышение (58,0±2,6) до (104,0±2,6) пг/мл гормона в крови после введения исходную только на 28 %.

Таблица 1. Концентрация гастрин в крови при однократном внутригастральном введении воды нафтуса

Раствор	Число животных	До введения
H_2O	8	58,0±2,6
NaCl	13	33,2±2,6
NaHCO_3	10	47,0±2,6
Na_2SO_4	10	38,1±2,6
CaCl_2	5	54,0±2,6
$\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$	10	36,2±2,6
CaSO_4	8	26,1±2,6
MgCl_2	5	51,6±2,6
$\text{Mg}(\text{HCO}_3)_2$	10	44,7±2,6
MgSO_4	10	27,4±2,6