

В нашій роботі описано дію КГЛ, введеного в організм, на окислення субстратів в МХ, активність амінотрансфераз, а також на вміст АХ і катехоламінів. Проведено співставлення дії КГЛ на дихання МХ з дією введенного АХ.

Досліди проводили на щурах-самцях масою 180—200 г. Дослідним тваринам внутрішньочеревно вводили 1 мл розчину α -кетоглутарату Na (20 мг/100 г) і AX (50 мкг/100 г), контрольним — 1 мл 0,9 %-вого розчину NaCl.

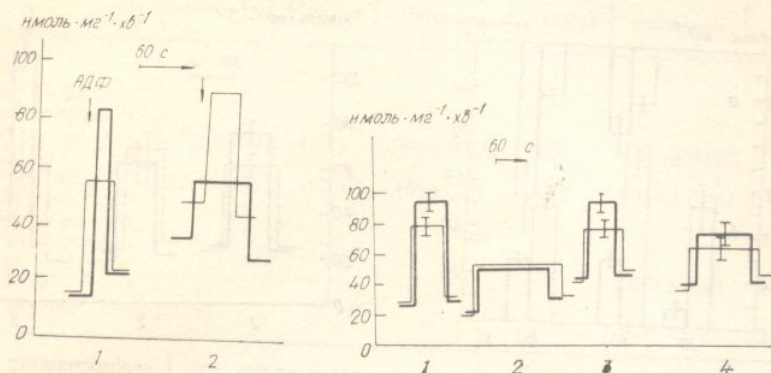
Дихання МХ реестрували полярографічним методом [6]. Середовище інкубації для МХ серця містило (ммоль/л): сахарозу — 300, KCl — 10, KH_2PO_4 — 1, EDTA — 0,5, *трис*-буфер — 5 (pH 7,4) і для МХ печінки: сахарозу — 150, KCl — 50, KH_2PO_4 — 1, *трис*-буфер — 5 (pH 7,4). Відповідно умовам інкубації в середовище інкубації додавали (ммоль/л): α -кетоглутарат — 1,0, сукцинат — 0,35, піруват — 3,0, ізоцитрат — 3,0, глутамат — 3,0, малат — 2,5, амінооксинацетат — 1,0. Дихання стимулювали АДФ (200 мкмоль/л). Активність аспартат- і аланінамінотрансфераз визначали за методом Осадчої [5], вміст холін-подібних речовин і холінестеразну активність — за методом Хестріна [13], а вміст адреноподібних речовин — за методом Ghosh і співавт. [12]. Концентрацію білка визначали за методом Lowry і співавт. [15]. Результати опрацювали методом варіаційної статистики за Стьюдентом [2].

При вивченні впливу КГЛ на енергетичні процеси в МХ ми застосовували розроблені раніше методичні підходи [4, 8], які спрямовані на виявлення вкладу окислення окремих субстратів в загальне поглинання кисню. При цьому використовували низькі, близькі до фізіологічних, концентрації субстратів (0,35—1 ммоль/л), на яких фізіологічні ефекти нейротрансмітерів більш виражені [1, 8]. Швидкість дихання МХ реєстрували в різних метаболічних станах за Chance [11] і її зміни представляли у вигляді діаграми (мал. 1).

Мал. 2. Усунення амінооксидохондрій печінки щура при глутамату: 1 — глутамат (3 ммоль/л); 2 — глутамат (3 ммоль/л) + амінооксиацетат (1 ммоль/л); 3 — амінооксиацетат (1 ммоль/л); 4 — амінооксиацетат (1 ммоль/л) + глутамат (3 ммоль/л).

Як і при введенні
лення двох вказаних с
лявся при окисленні
У випадку дії АХ вибі
валася за рахунок акт
ендогенного КГЛ [1].
активуючий вплив на о
пірувату з глутаматом
генного КГЛ в амінотр
переамінування в ефе
амінотрансфераз — амі
ливого до амінооксид
тварин, і стимулюючи
бітором переамінуванн
введеного КГЛ вказую
партат- і аланінаміно

Основний ефект введеного КГЛ на дихання і окислювальне фосфорилювання в МХ був подібним до такого при дії АХ і полягав у стимуляції окислення внутрішньомітохондріального КГЛ і гальмуванні окислення сукцинату, що виявлялося в реципрокній зміні швидкості АДФ-стимульованого дихання при окисленні вказаних субстратів (див. мал. 1). Крім швидкості дихання сильно змінювався час фосфорилювання, який удвічі зменшувався при окисленні КГЛ і майже удвічі збіль-



Мал. 1. Вплив введеного α -кетоглутарату Na на дихання мітохондрій серця щура при окисленні α -кетоглутарату (1) і сукцинату (2). Тонка лінія — введення 0,9%-ого розчину NaCl (контроль), товста — введення α -кетоглутарату Na (20 мг/100 г). Початкова частина діаграм відображає швидкість дихання при окисленні субстрату — стан 2, підйом швидкості дихання відповідає його стимуляції АДФ (200 мкмоль/л) — стан 3, наступне зниження — дихання за умов вичерпання АДФ і окислення субстрату — стан 4.

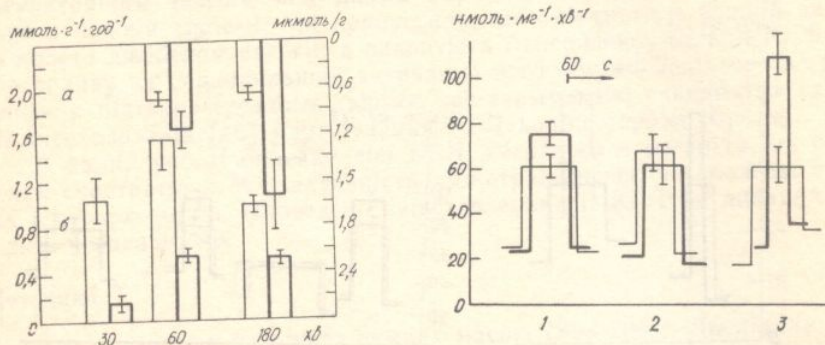
Мал. 2. Усунення амінооксиацетатом стимуляції α -кетоглутаратом Na дихання мітохондрій печінки щура при окисленні суміші глутамату і малату та пірувату і глутамату: 1 — глутамат (3 ммоль/л) та малат (2,5 ммоль/л); 2 — те ж саме та амінооксиацетат (1 ммоль/л); 3 — піруват (3 ммоль/л) та глутамат (3 ммоль/л); 4 — те ж саме та амінооксиацетат (1 ммоль/л).

шувався при окисленні сукцинату. Механізм і значення такої реципрокної дії на окислення вказаних субстратів нами обговорювалися при дії АХ [1]. Слід лише відзначити, що, активуючи окислення в МХ НАД-залежного субстрату (КГЛ), яке забезпечує відновленими еквівалентами роботу всіх ланок спряження дихального ланцюга, і гальмуючи зв'язане з інтенсивним поглинанням кисню окислення сукцинату, введений КГЛ призводить до значного підвищення ефективності окислювального фосфорилювання (коефіцієнт спряження дихання і окислювального фосфорилювання АДФ/О підвищується при окисленні КГЛ на 30 %). Це також відповідає результату впливу АХ на АДФ/О, при цьому ефект КГЛ навіть перевищує ефект АХ.

Як і при введенні АХ, виявлений вплив введеного КГЛ на окислення двох вказаних субстратів був специфічним, оскільки не проявлявся при окисленні інших субстратів циклу трикарбонових кислот. У випадку дії АХ вибіркова активація окислення КГЛ в МХ здійснювалася за рахунок активації амінотрансферазних реакцій і утворення ендогенного КГЛ [1]. У випадку введеного КГЛ ми також виявили активуючий вплив на окислення суміші глутамату з малатом, а також пірувату з глутаматом, що, очевидно, призводить до утворення ендогенного КГЛ в амінотрансферазних реакціях. З метою виявлення участі переамінування в ефекті введеного КГЛ використовували інгібітор амінотрансфераз — амінооксиацетат. Показано (мал. 2), що об'єм чутливого до амінооксиацетату дихання значно вищий в МХ дослідних тварин, і стимулюючий ефект інтермедиату повністю усувається інгібітором переамінування. На участь амінотрансфераз в механізмі дії введеного КГЛ вказують також результати вимірювання активності аспартат- і аланінамінотрансфераз в тканинах печінки і підшлункової за-

лози (табл. 1). Показано, що активність обох амінотрансфераз істотно зростає в досліджуваних тканинах, причому ефект КГЛ значно вищий в тканині підшлункової залози.

Отже, за впливом на окислення субстратів в МХ дія введених КГЛ і АХ виявилася практично ідентичною. Ми припустили, що ефект КГЛ може бути опосередкований дією АХ, зокрема інгібуванням хо- лінестерази [3]. Згідно з результатами наших досліджень, введення



Мал. 3. Вплив α -кетоглутарату Na на вміст ацетилхоліну (а) і холінестеразну активність (б) в тканині підшлункової залози щура. Тонка лінія — введення 0,9 %-вого розчину NaCl (контроль), товста — введення α -кетоглутарату Na (20 мг/100 г). Час дії відмічений на малюнку.

Мал. 4. Підсилення стимулюючого ефекту α -кетоглутарату Na на дихання мітохондрій печінки щура при його спільному введенні з ацетилхоліном і усунення цього ефекту при блокаді М-холінорецепторів атропіном: 1 — введення α -кетоглутарату Na (20 мг/100 г); 2 — введення атропіну (0,5 мг/100 г) за 15 хв до ін'єкції α -кетоглутарату Na; 3 — спільне введення α -кетоглутарату Na (20 мг/100 г) і ацетилхоліну (50 мкг/100 г). Інші позначення такі самі, як на мал. 1—3.

тваринам КГЛ призводить до значного підвищення вмісту АХ і зниження холінестеразної активності в тканині підшлункової залози через 30, 60 і 180 хв після введення інтермедиату (мал. 3). В тканині печінки поряд із підвищенням вмісту холінопоподібних речовин спостерігається зниження вмісту адренопоподібних речовин (табл. 2). Однак при цьому активність холінестерази вище контрольних значень. В цільній крові відзначається чітке зниження активності холінестерази (див. табл. 2).

На користь того, що ефект введеного КГЛ опосередкований підвищенням холінергічної активності, вказують також результати по усуненню стимулюючого ефекту КГЛ на енергетичний обмін в МХ печін-

Таблиця 1. Активність амінотрансфераз (мкмоль пірувату $\text{Na}^+ \cdot \text{г}^{-1} \cdot \text{год}^{-1}$) у тканинах печінки та підшлункової залози у щурів за умов внутрішньочеревного введення їм фізіологічного розчину (контроль) та α -кетоглутарату Na (КГЛ) а також відносний стимулюючий ефект КГЛ (% контрольної активності)

Об'єкт дослідження, умова досліджу	Аспаратамінотрансфераза		Аланінамінотрансфераза	
	Абсолютна активність	Відносна активність	Абсолютна активність	Відносна активність
Печінка (1 мл 0,9 %-вого розчину)				
NaCl	791 $\pm$ 16,2	100	1204 $\pm$ 57	100
КГЛ Na (20 мг/100 г)	1049 $\pm$ 11,8	132,6	1387 $\pm$ 87*	114,9
Підшлункова залоза				
NaCl (1 мл 0,9 %-вого розчину)	109,3 $\pm$ 3,44	100	172,5 $\pm$ 23,7	100
КГЛ Na (20 мг/100 г)	171,0 $\pm$ 14,97*	157,0	212,5 $\pm$ 25,4*	123,0

Примітка. Тут і в табл. 2 зірочкою позначена статистично достовірна різниця значень за умов досліджу та контролю.

Таблиця 2. Деякі показники за умов внутрішньочеревного введення α -кетоглутарату Na (КГЛ), а (% контрольного)

Об'єкт дослідження, умова досліджу	холінопоподібних	
	абсолютна	відносна
Печінка		
NaCl (1 мл 0,9 %-вого розчину)	0,89 $\pm$ 0,099	
КГЛ Na (20 мг/100 г)	1,427 $\pm$ 0,303	
Кров		
NaCl (1 мл 0,9 %-вого розчину)	...	
КГЛ Na (20 мг/100 г)	...	

ки при блокаді М-холіно підсилення стимулюючого (мал. 4, 3).

Таким чином, приведену схожість специфічної енергетичний обмін в МХ ного регуляторного зв'язку нати їх в медіаторно-сугТФ — цАМФ [8—10]. Ений КГЛ не поступаєть його утворення і окисле підвищення вмісту АХ і включені і інші механізми гізм КГЛ і АХ чітко ви результати відкривають та АХ.

N. M. Doliba, N. M. Kurgalyuk, I. V. Shostakovskaya, M. N. Ko

SYNERGY OF α -KETOGLUTARIC ACID ACTION ON ENERGY METABOLISM

The influence of Na α -ketoglutarate (20 mg/100 g of body weight) on substrate phosphorylation and cholinesterase activity in the rat liver and pancreas has been studied. It was found that the effect of α -ketoglutarate on energy metabolism and cholinesterase activity is reciprocal. This effect is selective and exceeds it for the value of substrate phosphorylation. Na α -ketoglutarate on energy metabolism and of acetylcholine liberation is mostly expressed in the liver. It is supposed that Na

I. Franko University, Ministry of Education, Lvov

Таблиця 2. Деякі показники нейрогуморального статусу в організмі щурів за умов внутрішньочеревного введення їм фізіологічного розчину (контроль) та α -кетоглутарату Na (КГЛ), а також відносний стимулюючий ефект КГЛ (% контрольного)

Об'єкт дослідження, умова досліджу	Концентрація речовин				Холінестеразна актив- ність, мкмоль·мл ⁻¹ ·год ⁻¹	
	холіноподібних, мкмоль/г		адреноподібних, мг/г		абсолютна	відносна
	абсолютна	відносна	абсолютна	відносна		
Печінка						
NaCl (1 мл						
0,9 %-вого роз- чину)	0,89±0,099	100	0,295±0,035	100	0,285±0,055	100
КГЛ Na (20 мг/100 г)	1,427±0,303	160,3	0,162±0,01	54,9	0,594±0,061	208,4
Кров						
NaCl (1 мл						
0,9 %-вого роз- чину)	...	...	...	...	3,857±0,60	100
КГЛ Na (20 мл/100 г)	...	...	...	...	1,98±0,09	51,3

ки при блокаді М-холінорецепторів атропіном (мал. 4, 1; 2), а також підсилення стимулюючого ефекту при його спільному введенні з АХ (мал. 4, 3).

Таким чином, приведені в роботі результати вказують на виражену схожість специфічної дії КГЛ і АХ при їх введенні в організм на енергетичний обмін в МХ. Ці результати підкреслюють наявність сильного регуляторного зв'язку між АХ і КГЛ, що дало можливість об'єднати їх в медіаторно-субстратно-нуклеотидну систему АХ—КГЛ—ГТФ—цАМФ [8—10]. Виявилося, що за вираженістю впливу введенний КГЛ не поступається медіатору. Він посилює дію індукованого його утворення і окислення медіатора. Можливо, що КГЛ здійснює підвищення вмісту АХ інгібуванням активності холінестерази. Не виключені і інші механізми опосередкування впливу інтермедіата. Синергізм КГЛ і АХ чітко виражений при їх спільному введенні. Одержані результати відкривають можливість використовувати КГЛ як синергіста АХ.

N. M. Doliba, N. M. Kurgalyuk, F. V. Muzyka,
I. V. Shostakovskaya, M. N. Kondrashova

SYNERGY OF α -KETOGLUTARATE AND ACETYLCHOLINE ACTION ON ENERGY METABOLISM IN MITOCHONDRIA

The influence of Na α -ketoglutarate intraperitoneally injected in dose of 20 mg per 100 g of body weight on substrate oxidation in the rat liver and heart mitochondria, cholinesterase activity in the blood, liver and pancreas and acetylcholine level in the rat liver and pancreas has been studied. α -ketoglutarate is found to have a pronounced reciprocal effect on intramitochondrial α -ketoglutarate and succinate oxidation (acceleration and inhibition, respectively). The effect of Na α -ketoglutarate is specific for the two substrates as it is absent when another substrate of the tricarboxylic acid cycle is oxidized. This selective influence on substrate oxidation is realized by means of activation of aminotransferase reaction, which lead to α -ketoglutarate production by transamination. This effect is almost the same as in case of acetylcholine injection and exceeds it for the value of some energy parameters. It is supposed that influence of Na α -ketoglutarate on energy metabolism is realized by means of cholinesterase inhibition and of acetylcholine level increase. The stimulation effect on oxidative phosphorylation is mostly expressed in case of joint injection of Na α -ketoglutarate and acetylcholine. It is supposed that Na α -ketoglutarate is a synergist to acetylcholine.

I. Franko University,
Ministry of Education, Lvov

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дбаг Мрван, Долиба Н. М., Кондрашова М. Н., Шостаковская И. В. Действие ацетилхолина на окисление субстратов в митохондриях сердца // Укр. биохим. журн.— 1991.— 63, № 4.— С. 68—74.
2. Деркач М. П., Гумецкий М. Я., Чабан М. Е. Курс варіаційної статистики.— К.: Виш. шк., 1977.— 207 с.
3. Каранова М. В. Регуляция уровня ацетилхолина в синаптических окончаниях мозга крысы // Нейрохимия и физиология синаптических процессов / Под ред. А. Ю. Буданцева.— Пушкино: Ин-т биол. физики АН СССР, 1976.— С. 48—62.
4. Кондрашова М. Н., Григоренко Е. В. Проявление стресса на уровне митохондрий, их стимуляция гормонами и регуляция гидроаэроионами // Журн. общ. биологии.— 1985.— 36, № 4.— С. 516—526.
5. Осадчая Л. М. Определение активности аминотрансфераз в тканях // Методы биохимических исследований: Сб. науч. ст.— Л., 1982.— С. 246—250.
6. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / Под ред. Г. М. Франко.— М.: Наука, 1973.— 221 с.
7. Шостаковская И. В., Долиба Н. М. Холинергическая регуляция энергетического обмена в митохондриях секреторных органов // Вестн. Львов. ун-та. Сер. биол.— 1988.— Вып. 19.— С. 3—17.
8. Шостаковская И. В., Долиба Н. М., Гордий С. К. и др. Активация ацетилхолином окисления α -кетоглутарата в митохондриях печени // Укр. биохим. журн.— 1986.— 58, № 5.— С. 54—61.
9. Babsky A. M., Doliba N. M., Kondrashova M. N., Shostakovskaya I. V. Interaction of neurotransmitters and substrates of oxidation // Signal molecules and mechanism of animal behavior: Symp. abstr.— Pushchino.— 1989.— P. 8.
10. Babsky A. M., Doliba N. M., Shostakovskaya I. V. Regulation of succinate and α -ketoglutarate oxidation into mitochondria by adrenaline and acetylcholine // 6-th European Bioenergetics conference.— Netherlands.— 1990.— P. 92.
11. Chance B., Hollunger G. The interaction of energy and electron transfer reaction in mitochondria // J. Biol. chem.— 1961.— 236, N 5.— P. 1534—1548.
12. Ghosh H. C., Deb C., Banerice S. Colometric determination of epinephrine in blood and adrenal gland // Ibid.— 1955.— 198, N 6.— P. 1567—1569.
13. Hestrin S. The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine and its analytical application // Ibid.— 1949.— 180, N 1.— P. 243—250.
14. Kondrashova M. N., Doliba N. M. Polarographic observation of substrate-level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine // FEBS Lett.— 1989.— 243, N 2.— P. 153—155.
15. Lowry O. H., Rosebrough N. I., Farr A. L., Randall R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.— 1951.— 193, N 1.— P. 265—275.
16. Maevsky E., Guzar I., Rosenfeld A. Doesn't succinate acid mediate adrenaline stimulation in mitochondria? // Second Eur. Bioenerg. Conf. Reports.— Lyone: Congress Edition, 1982.— P. 537—538.

Львів. ун-т ім. І. Франка
М-ва освіти України

Матеріал надійшов
до редакції 12.01.93

УДК 616—089.843:46.48:612.616.38

О. П. Потіха, І. С. Челнакова, І. С. Турчин

Ауто- і ксенотрансплантація органних культур сім'яників кастрованим щурам та щурам із експериментальним гіпогонадізмом

Получена органная культура семенников новорожденных поросят, способная продуцировать основные андрогены: тестостерон, дегидроэпиандростерон, андростендион, андростендиол. Созданы две модели экспериментального гипогонадизма: введением крысам хлорида кадмия (0,055 мг/100 г) и с помощью кастрации. Аутоотрансплантация органной культуры семенников крыс и ксенотрансплантация семенников новорожденных поросят крыс с экспериментальным гипогонадизмом (введение кадмия хлорида) вызывают повышение содержания тестос-

© О. П. ПОТІХА, І. С. ЧЕЛНАКОВА, І. С. ТУРЧИН, 1993

стерона в сыворотке крови в щ. Органн. культуры семенников рекомендованы для клиничес-

Вступ

Чоловіча безплідність є важ- тологічний процес у чоловіч- їх андрогенну функцію. Для хірургічні методи лікування шень чоловічої статеві функ- лікарів, а хірургічні мето- вийшли за межі клінічної а- методів лікування деяких ф- тур клітин і тканин сім'яни- упровадження в клінічну- ти в достатній кількості жи- тин сім'яників [7], створит- та перевірити ефективність.

Метою нашої роботи б- помоого введення хлориду- впливу трансплантації куль- них поросят на їх андроген-

Методика

Досліди виконані на 200 п- Кастрацію здійснювали пі- ний розріз мошонки, розті- і витягували його разом і- перев'язування останнього- у піхвовий канал старанн- гий сім'яник. Краї рани з- під'язичної вени кров і- радіоімунологічним мето- трансплантацію кастрован- ної культури клітин сім'я- 325 мг тканини на 100 г- кали за допомогою хлор- оптимальна доза (0,055 м- денні викликати гіпогона- тератури [5].

Органну культуру од- сім'яників новонароджен- на фрагменти від 0,5 до- розчином Хенкса і вміщу- вали 20 % інактивованої- біотики із розрахунку 10- ли до 7,4 5 %-вим стер- вували при 32 °С у терм- товували хоріонічний го- ша). Таким же засобом- вивчення аутоотрансплан- вадили в область живо- вування. За змінням- били висновок про впли- з моменту транспланта- трансплантації, вивчали- Стероїди, які виділюють- ще, екстрагували хлорс- вали 0,1 н NaOH та ди-

ISSN 0201—8489. Физиол. журн.