

L. TERAS

BIOFLAVONOIDIDE TOIMEST OKSÜDATSIOONILE JA OKSÜDEERIVALE FOSFORÜLEERIMISELE MAKSAKOE MITOKONDRITES

P-vitamiini (*resp.* bioflavonoidide) toimemehhanismis on paljude autorite [2, 28, 30] arvates tähtis koht bioflavonoidide mõjul kudede oksüdatsiooniprotsessidesse. Näit. rõhutavad A. Kursanov [23] ja M. Zaprometov [22], et bioflavonoidide tähtsuse nii taimse kui ka loomse organismi ainevahetuses määrab nende osavõtt hingamisprotsessidest.

Bioflavonoidide aktiivne osa taimede hingamisprotsessides on küllaldase veenvusega tõestatud [5], kuid nende mõju loomsete kudede respiratsiooniprotsessidesse on veel suhteliselt vähe uuritud.

Nii on teada, et bioflavonoidid etendavad mitmesugustes süsteemides redokskatalüsaatori funktsiooni [7] ja võtavad loomsetes kudedes osa askorbiinhappe [13] ning adrenaliini oksüdatsioonist [9, 19]. Nagu selgub C. Wawra ning L. Webbi [18] tööst, teostab hesperidiin vesiniku ülekannet ka maksa diaforaassüsteemis.

Otseseid eksperimentaalseid andmeid bioflavonoidide toime kohta hapniku kasutamisele loomsete kudede poolt kohtab kirjanduses vähe. Nii leidsid K. Lang ning H. Weyland [8], et rutiin *in vitro* ei mõjusta maksakoe homogenaadi respiratsiooni. Analoogilisi tulemusi said maksakoe ekstraktil *in vitro* katsetes J. Beiler ning G. Martin [1] peale rutiini veel kvartsetiini, katehiini, hesperidiini jt. flavonoidühenditega. Ka meie katsetulemustest [16, 17] nähtus, et rutiin ja teeledetest saadud katehiinid ei mõjustanud kudedes hapniku kasutamist *in vitro*. *In vivo* seevastu suurenes hapniku neeldumine maksa- ja lihaskoelõikudes nende bioflavonoidide mõjul tunduvalt. Nii tõstis rutiin hapniku neeldumist maksakoes maksimaalselt 20% võrra, katehiinid isegi kuni 44%.

Arvestades aga seda, et koelõikudes või homogenaatides võivad hapniku kasutamist peale hingamisfermentide mõjustada veel mitmesugused teised ensüümid (näit. glükolüüsi fermentid jne.), omavad bioflavonoidide osa selgitamisele kudede respiratsiooniprotsessidesse erilist tähtsust mitokondrite fraktsioonil tehtud tööd, kus sellised kõrvalmõjud pole olulised [25]. Kirjanduses õnnestus meil leida ainult kaks tööd, milles uuritakse bioflavonoidide toimet mitokondrite oksüdatsioonile. Nii leidsid K. Böhm ning W. Lamprecht [3], et maksast eraldatud mitokondrite mõjustamise tagajärjel rutiini, kvartsetiini või viteksiinramnosiidiga suureneb mitokondrites hapniku neeldumine ja väheneb anorgaanilise fosfori kasutamine. Vastupidi sellele näitas M. Oka [12], et Krebsi tsükliksse kuuluvate hapete oksüdatsioon maksakoe mitokondrites pidurdub, olenevalt kasutatud substraadist, 20–80% võrra nii rutiini, d-katehiini kui ka hesperidiini juuresolekul.

Mõlemas nimetatud töös on bioflavonoidide mõju mitokondritele uuritud *in vitro*, kuna toime kohta *in vivo* meil kirjandusest andmeid leida ei õnnestunud. Arvestades aga oma varasemates töödes koelõikudel saadud tulemusi, kust selgus, et bioflavonoidide mõju kudede hapniku kasutamisele avaldus peamiselt *in vivo* tingimustes, pakkus erilist huvi selgitada nende ainete toimet ka mitokondrite oksüdatsiooniprotsessidele just *in vivo*.

Arvestades kõike eespool toodut, võtsimegi endale ülesandeks selgitada mõnede bioflavonoidide (rutiini ja katehhiinide) toimet mitokondrite oksüdatsioonile ja oksüdeerivale fosforüleerimisele nii *in vivo* kui ka *in vitro*.

Metoodika

Katseteks kasutasime 150–200 g raskusi isaseid valgeid rotte.

In vivo katsete puhul süstiti 21 päeva vältel katseloomadele 1 kg kehakaalu kohta subkutaanselt 25 mg rutiini (firma «Chemapol», Praha) või teelehtedest valmistatud katehhiine (100%-lise aktiivsusega, toodetud Stšelkovo Vitamiinitehases). 3., 7. ja 21. katsepäeval surmati iga kord 6–9 katselooma ning määrati nende maksakoes oksüdatsiooni ja fosforüleerimise tase. Kasutatud bioflavonoidide järeloime selgitamiseks uuriti oksüdatsiooni ja fosforüleerimise taset maksakoes ka esimesel, teisel ja kolmandal nädalal peale preparaaside manustamise lõpetamist iga kord kahel katseloomal.

Nii *in vitro* kui ka *in vivo* katsed teostati valgete rottide maksakoe mitokondritel. Viimaste saamiseks peenendati 1 g maksakude kääride abil ja homogeniseeriti klaashomogenisaatoris külma 0,25M sahharoosilahusega (vahekorras 1:10). Rakutuumade, detriidi ja erütrotsüütide eemaldamiseks tsentrifuugiti homogenaat jahutusega tsentrifuugis 0° C temperatuuris 600 g juures 10 minuti vältel. Saadud tsentrifugaadist eraldati mitokondrid tsentrifuugimise abil 0° temperatuuris 9000 g juures 10 minuti vältel. Selles teel saadud mitokondrite sadet pesti sahharoosilahusega tsentrifuugides kaks korda ja suspendeeriti siis 6 ml-s 0,25M sahharoosilahuses.

Igasse katsesse võeti 0,5 ml mitokondrite suspensiooni, mis vastas 3–5 mg valgule. Valgu hulk mitokondrite suspensioonis määrati biureetreaktsiooni abil A. Cornalli jt. [4] poolt soovitatud metoodika järgi.

Mitokondrite oksüdatsioonivõimet jälgiti Warburgi manomeetrilise meetodiga, kusjuures inkubatsioonisegu (3 ml) koosnes järgmistest komponentidest: 90 μM fosfaatpuhvit (pH 7,4), 4 μM MgCl₂, 3 μM ATF, 2 μM NaF, 50 μM naatriumsuktsinaati (*in vitro* katsetes kasutati veel püroviinamarihappe või α-ketoglutaarhappe naatriumsoolasid), 60 μM glükoosi ja 50 ühikut heksokinaasi. Heksokinaas valmistati pärmist A. Solsi jt. [15] poolt soovitatud metoodika järgi ja tema aktiivsus määrati M. Kunitzi ning M. McDonaldi [6] poolt väljatöötatud metoodikaga. *In vitro* katsetes lisandati katsesegule veel rutiini või katehhiine nii, et viimaste lõppkontsentratsioon moodustas 10⁻⁴. Katse segu inkubeeriti Warburgi aparatuuril 37° temperatuuril 30 minutit.

Fosforüleerimise taseme üle mitokondrites otsustati katse vältel neeldunud anorgaanilise fosfori hulga alusel. Viimane määrati katsesegus enne ja pärast inkubeerimist O. Lowry' ning J. Lopez' [10] poolt soovitatud metoodika järgi.

Inkubeerimisel neeldunud hapniku ja fosfori hulk väljendati mikroaatomites. Suhte P:O leidmiseks jagati katse vältel neeldunud fosfori hulk sama aja jooksul kasutatud hapniku hulga.

Katsetulemuste matemaatilisel läbitöötamisel kasutati Studenti *t*-testi.

Töö tulemused

Rutiini ja katehhiinide toimet maksakoe mitokondritele *in vitro* uurisime 19 katseloomal. Substraadina kasutasime merevaikhappe, püroviinamarihappe või α-ketoglutaarhappe naatriumsoolasid, kusjuures uuritud

bioflavonoidide kontsentratsiooniks katsesegus valisime 1:10 000, mis meie varasemate kogemuste [16] põhjal ei oma autooksüdatsioonivõimet ja seega ise ei aktiivselt hapnikku.

Parema ülevaate saamiseks esitame merevaikhappe kui substraadi kasutamisel saadud katsetulemused tabelis 1.

Tabel 1

Katehhiinide ja rutiini toime maksakoe mitokondrite oksüdatsioonile ja fosforüleerimisele *in vitro*

Substraat	ΔO			ΔP			P:O		
	$\bar{x} \pm M$	P	P_{dif}	$\bar{x} \pm M$	P	P_{dif}	$\bar{x} \pm M$	P	P_{dif}
Na-suksinaat	15,1 ± 1,52	<0,01	—	16,0 ± 1,30	<0,01	—	1,12 ± 0,10	<0,01	—
Na-suksinaat + rutiin	16,0 ± 1,81	<0,01	>0,7	14,8 ± 2,05	<0,01	>0,6	0,99 ± 0,15	<0,01	>0,5
Na-suksinaat	17,0 ± 1,80	<0,01	—	19,6 ± 1,56	<0,01	—	1,24 ± 0,16	<0,01	—
Na-suksinaat + katehhiinid	18,8 ± 2,11	<0,01	>0,5	22,7 ± 3,2	<0,01	>0,3	1,30 ± 0,23	<0,01	>0,8

Märkus. Siin ja tab. 2 ning 3 on kasutatud järgmisi tähiseid:

\bar{x} — aritmeetiline keskmine, M — keskmine viga, P — keskmise tõenäosus, P_{dif} — kontroll- ja katserühma keskmiste erinevuse olulisus.

Nagu nähtub tabelist 1, ei suurendanud uuritud bioflavonoidide juuresolek katsesegus maksakoe mitokondrite oksüdatsiooni. Nii rutiini kui ka katehhiinide lisandamisel inkubatsioonikeskkonda ei erinenud O_2 neeldumine mitokondrites neist tulemustest, mis saadi ilma bioflavonoidideta katsesegudes ($P_{dif} > 0,05$).

Seda, et uuritud bioflavonoidid ei mõjusta mitokondrite oksüdatsioonivõimet *in vitro*, näitasid ka teiste hingamissubstraatidega saadud tulemused. Nii neeldus püroviinamarihappe kasutamisel substraadina rutiiniga katsetes keskmiselt 3,3 ja rutiinita 2,6 mikroaatomit hapnikku ($P_{dif} > 0,5$), kuna α -ketoglutaarhappe puhul olid tulemused vastavalt 4,7 ja 3,4 mikroaatomit ($P_{dif} > 0,3$). Samuti ei põhjustanud ka katehhiinid *in vitro* mitokondrite oksüdatsiooni tõusu püroviinamarihappe ja α -ketoglutaarhappe kui substraatide kasutamisel. Nii oli O_2 neeldumine püroviinamarihappe korral katehhiinide juuresolekul 6,5 mikroaatomit ja ilma katehhiinideta 6,7 mikroaatomit ($P_{dif} > 0,9$) ning α -ketoglutaarhappe puhul vastavalt 6,4 ja 4,6 mikroaatomit ($P_{dif} > 0,1$).

Samuti nagu hapniku kasutamisele ei toimunud uuritud bioflavonoidid *in vitro* ka anorgaanilise fosfori neeldumisele mitokondrites. Rutiini juuresolekul (substraadiks merevaikhape) neeldus katses keskmiselt 14,8 mikroaatomit fosforit, kuna ilma rutiinita — 16,0 mikroaatomit ($P_{dif} > 0,6$). Rutiin ei mõjutanud samuti püroviinamarihappe ja α -ketoglutaarhappe korral oksüdeerivat fosforüleerimist mitokondrites. Ka katehhiinide lisandamine katsesegusse ei põhjustanud ühegi kasutatud substraadi korral, võrreldes kontrolliga, muutusi fosfori neeldumises.

Vastavalt eespool toodule ei erinenud P:O väärtus ei rutiini ega katehhiinide lisandamisel katsesegusse neist tulemustest, mis saadi bioflavonoidideta katsesegus.

Vastupidi *in vitro* saadud tulemustele mõjustasid uuritud bioflavonoidid *in vivo* nii mitokondrite oksüdatsioonivõimet kui ka oksüdeerivat fosforüleerimist.

Tabelist 2, kus on esitatud andmed rutiini saanud katseloomade kohta, nähtub, et maksa mitokondrite poolt kasutatud O_2 hulk oli pärast 3-päevast rutiini manustamist mõnevõrra langenud. See hapniku neeldumise vähenemine möödus aga rutiini manustamise jätkamisel kiiresti ja 7. katsepäeval täheldasime juba mitokondrite oksüdatsioonivõime mõningat suurenemist. Nii oli O_2 neeldumine katseloomade mitokondrites 7. päeval ca 16% võrra suurem kui kontroll-rühmas ($P_{dif} > 0,05 < 0,1$). Ka 21. katsepäeval oli maksakoe mitokondrite oksüdatsioonivõime mõnevõrra kõrgenenud, moodustades keskmiselt 10,8 mikroatomit O_2 .

Tabel 2

Rutiini toime maksakoe mitokondrite oksüdatsioonile ja fosforüleerimisele *in vivo*

Katsepäevad	Katseloomade arv	ΔO			ΔP			P : O		
		$\bar{x} \pm M$	P	P_{dif}	$\bar{x} \pm M$	P	P_{dif}	$\bar{x} \pm M$	P	P_{dif}
3	7	8,5 ± 0,91	<0,01	>0,2	11,9 ± 0,96	<0,01	<0,01	1,46 ± 0,12	<0,01	<0,05
7	9	11,5 ± 0,63	<0,01	<0,1	16,5 ± 1,28	<0,01	>0,2	1,44 ± 0,09	<0,01	<0,01
21	7	10,8 ± 0,56	<0,01	>0,3	16,0 ± 1,10	<0,01	>0,1	1,53 ± 0,18	<0,01	>0,1
Kontroll	9	9,9 ± 0,64	<0,01		18,7 ± 1,41	<0,01		1,93 ± 0,13	<0,01	

Peale rutiini manustamise lõpetamist olid uuritud katseloomade maksa mitokondrite oksüdatsiooni näitajad esimese, teise ja kolmanda nädala jooksul võrdsed respiratsiooni keskmise väärtusega kontroll-rühmas.

Samasuguseid muutusi, nagu leidsime mitokondrite oksüdatsioonivõime jälgimisel, täheldasime rutiini manustamise korral ka oksüdeerivas fosforüleerimises. Üheaegselt oksüdatsiooni vähenemisega langes ka anorgaanilise fosfori neeldumine 3. katsepäevaks. Vastavalt sellele, et rutiini manustamisel vähenes fosfori neeldumine rohkem kui hapniku kasutamine, oli ka P:O 3. katsepäeval väiksem kui kontroll-rottidel ($P_{dif} < 0,05$). Anorgaanilise fosfori kasutamine jäi madalale tasemele ka rutiini manustamise jätkamisel. Vastavalt oksüdatsioonivõime suurenemisele ja fosfori kasutamise vähenemisele oli P:O suhe väiksem kui kontroll-rühmas nii 7. kui ka 21. päeval peale rutiini manustamise algust.

Samuti nagu oksüdatsioon olid ka fosforüleerimine ja P:O suhe esimesel, teisel ja kolmandal nädalal peale rutiini manustamise lõpetamist võrdsed kontroll-rühma vastavate andmetega.

Veel rohkem kui rutiin mõjustasid maksakoe mitokondrite oksüdatsiooni teelehtedest saadud katehhiinid. Ka katehhiinide parenteraalne manustamine põhjustas katseloomadel esialgu oksüdatsioonivõime languse. Nagu nähtub tabelist 3, kus on esitatud katehhiine saanud katseloomade oksüdatsiooni ja fosforüleerimise uurimise tulemused, moodustas mitokondrite hingamisvõime 3. katsepäeval ca 80% kontroll-rühmas täheldatud väärtusest. Nagu rutiini manustamisel möödus ka katehhiinide puhul mitokondrite oksüdatsioonivõime esialgne langus preparaadi edasisel süstimisel kiiresti. Vastupidiselt 3. katsepäeval saadud tulemustele oli mitokondrite hingamisvõime 7. katsepäeval juba märgatavalt

Tabel 3

Katehhiinide toime maksakoe mitokondrite oksüdatsioonile ja fosforüleerimisele *in vivo*

Katse- päevad	Katse- loomade arv	ΔO			ΔP			P : O		
		$\bar{x} \pm M$	P	P_{dif}	$\bar{x} \pm M$	P	P_{dif}	$\bar{x} \pm M$	P	P_{dif}
3	8	7,9 \pm 0,68	<0,01	<0,05	14,3 \pm 1,24	<0,01	= 0,05	1,81 \pm 0,05	<0,05	= 0,4
7	6	13,1 \pm 1,46	<0,01	<0,05	18,6 \pm 1,95	<0,01	—	1,43 \pm 0,11	<0,01	<0,02
21	9	15,1 \pm 0,99	<0,01	<0,05	23,9 \pm 1,68	<0,01	<0,05	1,63 \pm 0,05	<0,01	= 0,05
Kontroll	9	9,9 \pm 0,64	<0,01		18,7 \pm 1,41	<0,01		1,93 \pm 0,13	<0,01	

suurem, moodustades keskmiselt 13,1 mikroaatomit O_2 , mis ületab kontroll-loomade maksa mitokondrite respiratsiooni väärtuse ca 32%-ga ($P_{dif} < 0,05$). Mitokondrite oksüdatsioon oli kõrgenenud ka 21. katsepäeval, moodustades keskmiselt 15,1 mikroaatomit O_2 , s. o. ca 50% enam kui kontroll-loomadel ($P_{dif} < 0,05$). Ka nädal pärast katehhiinide manustamise lõpetamist oli hapniku kasutamine maksakoe mitokondrites (10,7 mikroaatomit O_2) mõnevõrra suurem kui kontroll-rühmas. Teisel ja kolmandal nädalal aga ei erinenud katehhiine saanud katseloomade mitokondrite respiratsioon kontroll-loomade omast.

Samuti nagu rutiin mõjustasid ka katehhiinid fosforüleerimisprotsesse mitokondrites. Nii langes fosfori neeldumine ka katehhiinide mõjul juba 3. katsepäevaks, kuid vähemal määral, võrreldes rutiiniga. Seetõttu, võrreldes kontroll-rühmaga, ei muutunud P:O suhe peale 3-päevast katehhiinide manustamist. 7. katsepäeval oli P neeldumise väärtus katseloomade mitokondrites sama mis kontroll-rottidel ja 21. katsepäeval see koguni suurenes. Vastavalt sellele, et katehhiinide mõjul tõusis hapniku kasutamine tunduvalt, kuna fosfori neeldumine jäi kas esialgsele tasemele või muutus vähe, täheldasime nii 7. kui ka 21. katsepäeval P:O suhte vähenemist ($P_{dif} \geq 0,05$).

Peale katehhiinide manustamise lõpetamist täheldasime nii esimesel, teisel kui ka kolmandal katsenädalal samasuguseid fosfori neeldumise ja P:O väärtusi kui kontroll-rühmas.

Kokku võttes saadud tulemusi näeme, et rutiin ja katehhiinid *in vitro* ei mõjustanud mitokondrites ei oksüdatsiooni ega fosforüleerimist. Et bioflavonoidid *in vitro* ei mõjusta kudede hingamisvõimet, seda on koelõikudel või homogenaatidel peale meie [16] näidanud veel J. Beiler ning G. Martin [1] ja K. Lang ning H. Weyland [8]. Ka K. Böhm ning W. Lamprecht [3] suutsid rutiini, kvartsetiini jt. bioflavonoidide toimet *in vitro* demonstreerida mitokondritel alles peale viimaste ühetunnist mõjustamist 2° temperatuuris nende bioflavonoididega, muutes sel teel tõenäoliselt mitokondrite permeaablust. Seetõttu näivad M. Oka [12] katsetulemused *in vitro* bioflavonoidide tugeva pärssiva toime kohta merevaik-, püroviinamari- ning α -ketoglutaarhappe jt. Krebse tsüklisse kuuluvate hapete oksüdatsioonile moodustavat üksiku erandi.

Vastupidiselt *in vitro* katsetele ilmselt uuritud bioflavonoidide puhul mitokondrite oksüdatsiooni suurendav toime täiesti selgesti *in vivo*. Juba 7. katsepäevaks tõusis maksakoe mitokondrite oksüdatsioon nii rutiini kui ka katehhiinide parenteraalsel manustamisel. Seejuures on huvitav märkida, et samuti nagu koelõikude hapniku kasutamisele [17] avaldasid katehhiinid ka mitokondrite oksüdatsioonile märksa tugevamat toimet kui

rutiin. Nii tõusis mitokondrite oksüdatsioon rutiini toimet maksimaalselt 16%, katehhiinide mõjul aga ca 50%. Katehhiinide puhul oli oksüdatsiooni suurendav toime, võrreldes rutiiniga, ka märksa kestvam. Kui katehhiinide puhul maksa mitokondrite oksüdatsioon püsis kõrgeenenuna preparaadi manustamise lõpuni (s. o. 21. katsepäevani) ja isegi pärast seda, siis rutiini puhul oli vastav tõus 21. katsepäeval märksa tagasihoidlikum.

Ka kirjanduse andmeil [20, 26] on rutiinil, võrreldes teiste bioflavonoididega, kõige madalam ja teehtedest saadud katehhiinide preparaadil kõige kõrgem bioloogiline aktiivsus. Paljude autorite [21, 24 jt.] arvates on see tingitud suuremast vabade OH-rühmade hulgast külgmises ahelas.

Üheaegselt oksüdatsiooni suurenemisega kutsus bioflavonoidide manustamine katseloomade maksakoe mitokondrites esile muutusi ka fosforiainevahetuses. Nii rutiini kui ka katehhiinide puhul esines tendents oksüdeeriva fosforüleerimise vähenemisele mitokondrites. Ka K. Böhm ning W. Lamprecht [3] täheldasid eespool kirjeldatud töötlemise järel oksüdeeriva fosforüleerimise langemist mitokondrites, mis väljendus P:O suhte vähenemises kuni 38% võrra. Bioflavonoidide toime kohta fosforüleerimisprotsessidesse ei leidunud kättesaadavas kirjanduses rohkem andmeid.

Asjaolu, et peaaegu kõigis meie katseis ilmnes matemaatiliselt oluline P:O suhte vähenemine, lubab oletada, et bioflavonoidid suurendavad just fosforüleerimises sõltumatult ehk vaba oksüdatsiooni. Nagu kirjandusest nähtub, on viimasel aastakümnel ilmunud juba küllaldaselt andmeid, mis lubavad vaba oksüdatsiooni pidada koehingamise füsioloogiliseks vormiks [27, 29 jt.]. Ka on leitud, et olenevalt tingimustest võivad fosforüleeriv ja vaba oksüdatsioon teineteiseks üle minna [29].

Arvestades käesoleva töö tulemusi, näib olevat tõenäoline, et bioflavonoidid mõjustavad organismi ainevahetuse üht tähtsat lüli — oksüdatsiooniprotsesse —, kusjuures näib aktiveeruvat just vaba oksüdatsioon. Pole võimatu, et bioflavonoidide kasutamisega saab kudedes vaba oksüdatsiooni aktiveerida samuti nagu fosforüleerivat oksüdatsiooni K- ja E-vitamiini abil [11, 14].

KIRJANDUS

1. Beiler J., Martin G. The inhibition of xanthine oxidase by flavonoids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, 1951, **192**, 2, 831—834.
2. Böhm K. Die Flavonoide, III. *Arzneimittel-Forsch.*, 1959, **9**, 12, 778—785.
3. Böhm K., Lamprecht W. Flavonoide und Herzmuskelstoffwechsel. *Ärztl. Forschung*, 1959, **13**, 11, 543—548.
4. Cornell A., Bardawill C., David M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 1949, **177**, 2, 751—766.
5. Huszák S. Über die Funktion des Peroxydase-Systems der Pflanzen. *Z. physiol. Chem.*, 1937, **247**, 239—247.
6. Kunitz M., McDonald M. Crystalline hexokinase. *J. Gen. Physiol.*, 1946, **29**, 6, 393—412.
7. Kühnau J. Rutin, ein neuer wasserlöslicher Wirkstoff von Vitamincharakter. *Klin. Wochenschr.*, 1949, **27**, 294—297.
8. Lang K., Weyland H. Über den Stoffwechsel des Rutins und Quercetins. *Biochem. Z.*, 1955, **372**, 2, 109—117.
9. Lavollay J. L'autoxydation des difenols en particulier de l'adrénaline. Paris, 1943.
10. Lowry O., Lopez J. The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. *J. Biol. Chem.*, 1946, **162**, 3, 421—428.
11. Martius C., Nitz-Litzow D. Oxidative Phosphorylierung und Vitamin K Mangel. *Biochim. et biophys. acta*, 1954, **13**, 152.
12. Oka M. Pharmacological studies on flavonoids, especially on their relation to the effect of adrenaline action in carbohydrate metabolism, II. *Folia pharmacol. japon.*, 1961, **57**, 5, 566—576.

13. Parrot J., Cotereau H. L'économie de l'acide l-ascorbique dans l'organisme. Internat. Z. Vitaminforsch., 1957, 27, 3, 345—364.
14. Slater E. Respiratory chain phosphorylation. Proc. III Inter. Congress of Biochemistry. N. Y., 1956, 264—277.
15. Sols A., Fuente G., Villar-Palasi C., Asensio C. Substrate specificity and some other properties of baker's yeast hexokinase. Biochim. et biophys. acta, 1958, 30, 92—101.
16. Teras L. Rutini ja teehtedest valmistatud katehhiinpreparaatide mõjust loomsete kudede hingamisele, I. ENSV TA Toimet. Biol. Seeria, 1962, 1, 41—46.
17. Teras L. Rutini ja teehtedest valmistatud katehhiinpreparaatide mõjust loomsete kudede hingamisele, II. ENSV TA Toimet. Biol. Seeria, 1962, 2, 96—106.
18. Wawra C., Webb L. The isolation of a new oxidation-reduction enzyme from lemon peel (vitamin P). Science, 1942, 96, 302—303.
19. Березовская Н. Н. Влияние биофлавоноидов на ферментное окисление аскорбиновой кислоты и адреналина в животных тканях. Биохимия, 1964, 29, 1, 30—34.
20. Букин В. Н., Ерофеева Н. Н. Сравнительная Р-витаминная активность катехинов чая, дубильных веществ винограда и рутина гречихи. Докл. АН СССР, 1954, 98, 6, 1011—1013.
21. Ерофеева Н. Н. Биологическая методика и результаты испытания активности веществ, обладающих действием витамина Р. В сб.: Витаминные ресурсы и их использование. М., 1959, 4, 171—179.
22. Запрометов М. Н. Витамин Р, его свойства и источник получения. В сб.: Совр. вопр. сов. витаминологии. М., 1955, 48—64.
23. Курсанов А. Л. Предисловие к русскому изданию. В сб.: Биофлавоноиды и проницаемость капилляров. М., 1957, 5—9.
24. Курсанов А. Л., Запрометов М. Н., Ерофеева Н. Н. Витаминная активность катехинов чайного листа. Биохимия, 1952, 17, 729—733.
25. Линдберг О., Эрнстер Л. Химия и физиология митохондрий и микросом. В сб.: Проблемы цитофизиологии. М., 1957, 111—225.
26. Литвак Р. И., Шкловская Р. Ш. Применение витамина Р из листьев чая при капилляро-токсикозе у детей. В сб.: Витаминные ресурсы и их использование. М., 1959, 4, 240—245.
27. Северин С. Е. Определение и условия сохранения сопряженности между дыханием и фосфорилированием. В сб.: Фосфорилирование и функция. Л., 1960, 111—125.
28. Сибулъ И. К., Куллъ М. М. К вопросу лечебного действия рутина. В сб.: Современные данные по лечебному применению витаминов. М., 1960, 54—60.
29. Скулачев В. П. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М., 1962.
30. Шамрай Е. Ф. Химическое и функциональное взаимодействие витаминов С и Р. Тр. V Междунар. Биохим. конгресса. Реф. секцион. сообщений. М., 1961, 1, 515.

NSV Liidu Meditsiiniteaduste Akadeemia
Eesti Eksperimentaalse ja Kliinilise Meditsiini Instituut

Saabus toimetusse
26. X 1964.

L. TERAS

О ВЛИЯНИИ БИОФЛАВОНОИДОВ НА ОКИСЛЕНИЕ И ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ФОСФОРИЛИРОВАНИЕ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ

Резюме

Исследовалось влияние рутина и катехинов из чайных листьев на процессы окисления и окислительного фосфорилирования в митохондриях печени белых крыс *in vitro* и *in vivo*.

В опытах *in vivo* исследуемые биофлавоноиды вводили белым крысам по 25 мг на 1 кг веса ежедневно в течение 21 дня. Уровень окисления и окислительного фосфорилирования определяли на 3-ий, 7-ой и 21-ый день опыта, а также на первой, второй и третьей неделе после окончания введения биофлавоноидов.

Митохондрии выделяли в 0,25 М растворе сахарозы дробным центрифугированием при 9000 g. Для опыта брали по 0,5 мл суспензии митохондрий, что соответствует 3—5 мг белка, количество которого определяли биуретовым методом [4]. Инкубационная смесь содержала следующие компоненты: 90 мкмоль фосфатного буфера (pH 7,4), 4 мкмоль $MgCl_2$, 3 мкмоль АТФ, 2 мкмоль NaF, 50 мкмоль янтарнокислого натрия (в опытах *in vitro* использовали в качестве субстрата еще натриевую соль пировиноградной или α -кетоглутаровой кислот), 60 мкмоль глюкозы и 50 единиц [6] дрожжевой гексокиназы, выделенной по методу А. Солса и др. [15]. В опытах *in vitro* добавляли также рутин или катехины в концентрации 10—4. Смесь инкубировали в аппарате Варбурга при 37°C в течение 30 минут. Убыль неорганического фосфора определяли по методу О. Лоури и Дж. Лопеса [10].

Результаты опытов показали, что рутин и катехины *in vitro* не оказывали действия на окисление и окислительное фосфорилирование в митохондриях печени. То, что биофлавоноиды не влияют на дыхательную способность тканей, показано на срезах тканей или гомогенатах нами [16], Дж. Бейлером и Г. Мартином [1], К. Лангом и Х. Вейландом [8]. К. Бэм и В. Лампрехт [9] также смогли продемонстрировать действие рутина, кварцетина и других биофлавоноидов на митохондриях *in vitro* только после предварительной инкубации митохондрий этими биофлавоноидами в течение 1 часа при 2°. Поэтому результаты опытов М. Ока [12], из которых явствует, что различные биофлавоноиды сильно угнетают окисление кислот цикла Кребса, кажутся исключением.

Действие исследованных биофлавоноидов на окисление митохондрий печени было ясно выражено *in vivo*. На 3-ий день опыта было зарегистрировано некоторое снижение потребления кислорода, которое, однако, скоро прекратилось, и уже на 7-ой день опыта мы наблюдали повышение окисления митохондрий при введении как рутина, так и катехинов. Интересно отметить, что как на потребление кислорода срезами тканей [17], так и на окисление митохондрий, катехины оказывали более сильное действие, чем рутин. Окисление митохондрий печени повышалось под влиянием рутина на 7-ой день опыта на 16%, при введении же катехинов — на 32%, а на 21-ый день — более, чем на 50%. Действие катехинов, по сравнению с рутином, было также более продолжительным. Если при введении катехинов окисление митохондрий оставалось повышенным весь период введения препарата (т. е. 21 день) и даже после прекращения введения катехинов, то при рутине эффект ослабевал уже к 21-му дню.

Одновременно с повышением окисления введение биофлавоноидов подопытным животным вызывало изменения и в обмене фосфора. Как при введении рутина, так и катехинов, наблюдалась тенденция к уменьшению окислительного фосфорилирования. То, что почти во всех наших опытах было зарегистрировано математически достоверное уменьшение коэффициента P:O, позволяет предполагать, что биофлавоноиды активизируют именно несопряженное с фосфорилированием, или свободное, окисление. Нужно отметить, что и К. Бэм и В. Лампрехт [9] наблюдали после вышеуказанной обработки митохондрий понижение окислительного фосфорилирования, что выражалось в уменьшении P:O до 38%.

Если учесть полученные в настоящей работе результаты, кажется вероятным, что биофлавоноиды оказывают влияние на одно из важнейших звеньев обмена веществ организма — на окислительные процессы, причем, очевидно, активизируется именно свободное окисление. Вполне вероятно, что биофлавоноидами можно активизировать свободное окисление тканей также, как с помощью витаминов К и Е фосфорилирующее окисление [11, 14].

Эстонский институт экспериментальной
и клинической медицины
Академии медицинских наук СССР

Поступила в редакцию
26/X 1964

L. TERAS

THE INFLUENCE OF BIOFLAVONOIDS UPON THE OXIDATION AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION IN LIVER MITOCHONDRIA

Summary

The influence of rutin and catechins extracted from tea leaves upon the oxidation and oxidative phosphorylation in liver mitochondria *in vitro* and *in vivo* was studied.

In experiments *in vivo*, the bioflavonoids studied were administered to rats subcutaneously in a dosis of 25 mg per one kg of weight during a period of 21 days. The oxidation and oxidative phosphorylation were determined on the 3rd, 7th and 21st day

of experiment, and after the end of administration of bioflavonoids in the 1st, 2nd and 3rd week.

The results of experiments revealed that rutin and catechins in a concentration 10^{-4} did not influence the rate of oxidation and oxidative phosphorylation in liver mitochondria *in vitro*.

The experiments *in vivo* showed that the bioflavonoids studied have a significant influence on the oxidation of liver mitochondria. On the 3rd day of experiment some decrease of oxygen uptake was recorded, which, however, passed quickly, and already by the 7th day we observed the increase of oxidation of mitochondria at the administration of rutin as well as catechins. It is of interest that catechins influence the oxidation of mitochondria considerably more than rutin. Thus the oxidation of liver mitochondria increased by 16 per cent on the 7th day of experiment with rutin, whereas in the case of the administration of catechins it increased by 32 per cent, and on the 21st day by more than 50 per cent. The effect of catechins also lasted longer than that of rutin. At the administration of catechins the oxidation was increased during the whole period of experiment (21 days), and even after the end of administration, whereas the effect of rutin diminished already on the 21st day of experiment.

The administration of bioflavonoids also influenced the phosphorus metabolism. At the administration of rutin as well as catechins we observed a tendency of a decrease of the oxidative phosphorylation. In connection with the fact that almost in every experiment we observed a mathematically significant decrease of P:O, it may be presumed that bioflavonoids caused an increase of oxidation uncoupled with phosphorylation, or a so-called free oxidation. It is likely that with the administration of bioflavonoids we can probably increase free oxidation like with the administration of vitamin K and E -- an oxidation coupled with phosphorylation.

Academy of Medical Sciences of the U.S.S.R.,
Estonian Institute of Experimental and Clinical Medicine

Received
Oct. 26th, 1964