

I. SIBUL

FOSFORÜLEERUMISE JA HINGAMISE SEOSE TUGEVNEMISEST HUMISOOLI TOIMEL*

Meie varasematest uurimustest (Сибуль, 1960, 1961, 1963) on selgunud, et Eesti mererannikul kohati leiduvast ravimudast valmistatud humiinhapeterikas preparaat humisool** pärssib valgetel hiirtel aju adenosiintrifosfaasi (ATF-aasi) ja atsetüülkoliinesteraasi aktiivsust. Olles manustanud humisooli konnadele, võisime täheldada neist saadud seljaajupreparaatidel eluperioodi tunduvat pikenemist, kemoretseptoorse tundlikkuse tõusu ja refleksiaja lühenemist (Сибуль, 1959, 1961). Need tähelepanekud lubavad oletada, et ATF-aasi aktiivsuse pärssimise kaudu šaiilitab humisool adenosiintrifosfaadi (ATF)-sisaldust närvirakkudes. Ühtlasi näib meile tõepärasena, et humisool võib ka soodustada ATF-i resünteesi. Nende küsimuste lahendamiseks uurisime, kas humisool mõjustab aju homogenaadis oksüdatiivset fosforüleerumist.

Metoodika

Kuusteist tundi enne katse algust manustati valgetele hiirtele subkutaanselt 1 ml humisooli naatriumkloriidi isotoonilises lahuses kontsentratsiooniga 1:100, kontrollhiirtele aga ainult naatriumkloriidilahust samas koguses. Hiired surmati kuklalöögiga, kiiresti eraldati nende aju koljust ja homogeniseeriti jääkülmas uhmris spetsiaalse meediumlahusega. 1 ml homogenaati sisaldas 100 mg aju. Homogenaate inkubeeriti Warburgi aparatuuris Decsi ja Nádori (1958) eeskirjade järgi koostatud spetsiaalse ingrediendilahusega 37°C temperatuuril atmosfäärse õhu juures ja määrati nende hapniku ja anorgaanilise fosfori neeldumise võime, mis arvutati ümber 1 g ajukoe kohta tunnis. Viimaste alusel leiti katsegruppides P:O, mis näitab ajukoe oksüdatsiooni ja fosforüleerumise seose astet. Hingamise substraatidena kasutati püruvaati ja õunhapet.

Uurimistulemused

Andmed hapniku ja fosfori neeldumise kohta katse- ja kontrollrühma hiirte aju homogenaadis esitatakse kokkuvõetult tabelis. *In vivo* katsete tulemused näitavad, et parenteraalselt manustatud humisool tõstab hiire aju homogenaadis anorgaanilise fosfori omastamise või neeldumise ligikaudu kolmekordseks, võrreldes kontrolliga ($P < 0,01$), kuid hapniku

* Töö teostati ENSV TA Eksperimentaalse ja Kliinilise Meditsiini Instituudis 1962. a.

** Humisool on Haapsalu meremudast valmistatud ravimpreparaat, mis sisaldab 0,01% humiinhapeterikast fraktsiooni naatriumkloriidi isotoonilises lahuses (Keel, 1963).

neeldumist vähendab üksnes mõõdukalt ($P < 0,1$). Fosfori ja hapniku neeldumise võime nihked kokku tõstsid vastava rühma P:O väärtuse neljakordselt, võrreldes kontrolliga. See aga tähendab oksüdatsiooni ja fosforüleerumise seose väga olulist tugevnenemist, vaatamata selle näitaja mitte eriti kõrgele üldisele tasemele.

Humisooli lisandamine aju homogenaadile andis põhiliselt samu tulemusi mis humisooli parenteraalne manustamine. Nagu näitab tabel, tõstis 0,01 ml humisooli lisandamine inkubeeritava homogenaadi segule anorgaanilise fosfori neeldumise võimet kudedel ka *in vitro*, samuti kui *in vivo*, ligikaudu kolmekordselt ($P < 0,05$). Hapniku neeldumine vähenes sel puhul ainult 8–9%, mis variatsioonstatistiliselt polnud usaldatav. P:O selles katseseerias kasvas humisooli toimel kolmekordselt.

Et P:O humisooli lisandamisel aju homogenaatidele suurenes ligikaudu niisama palju kui preparaadi eelneva manustamise korral katseloomadele, on väga oluline fakt, mis räägib sellest, et humisool ei oma oksüdatsiooni ja fosforüleerumise seose suhtes üksnes «kaitsevõimet», vaid et ta on suuteline ka uuesti seostama või taastama juba lahutunud oksüdatiivset fosforüleerumist.

Humisooli toimet ajukoe makroergiliste ühendite ainevahetusesse pole seni uuritud. Meile kättesaadavast kirjandusest õnnestus leida ainult üks töö, milles näidati humaatide aktiveerivat toimet ATF-i moodustavatesse protsessidesse substraadi tasemel (Reřabek, 1962). Nimelt uurinud taimede juures mõningate metaboolsete märkide toime foonil hümiinhapete kui kasvufaktori osatähtsust, tuli see autor järeldusele, et humaatidele on omaseks «kaitsetoime» ATF-i moodustavate protsesside suhtes.

Meie tähelepanekud on kahtlemata oluliseks lisandiks üldistele teadmistele humisooli neurotroopsetest omadustest. Nad lubavad väita, et humisool aitab oksüdatsiooni ja fosforüleerumise seose tugevdamise kaudu normaliseerida kurnatud närvirakkude makroergiliste ühendite ainevahetust. See seisukoht ei kinnita üht meie varasemat oletust, et humisooli toimel kesknärvisüsteemisse on teatav sarnasus tsentraalsete ganglioniblokaatorite mõjuga (Сибуль, 1963). Viimaste toime keskseks farmakobiokemiliseks tunnuseks on just oksüdatiivse fosforüleerumise lahutamine (Decsi, Nádor, 1958).

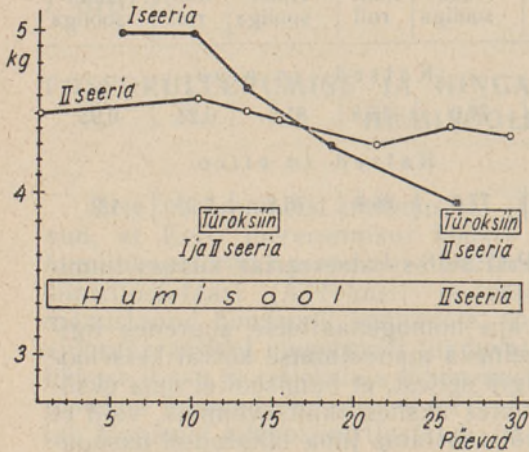
Käesoleva töö tulemused selle kohta, et humisool seostab fosforüleerumist hingamisega, ei ütle midagi lähemat protsessi konkreetsest mehhanismist. Kuna ATF-il endal on võime seostada lahutunud oksüdatiivset fosforüleerumist (Скулачев, 1962), siis võib mõelda, et humisool oma ATF-aasi aktiivsust pärssiva toimega aeglustab selle keskse makroergilise ühendi kiiret lagunemist, aidates sellega säilitada oksüdatiivse fosforüleerumise seost närvikoos. Sellise käsitelu vastu räägivad aga tähelepanekud, et mitte kõik ATF-aasi aktiivsust pärssivad ühendid, nagu tsentraalsed ganglioniblokaatorid, luminaal jt., ei seo, vaid hoopiski lahutavad oksüdatiivset fosforüleerumist (Decsi, Nádor, 1958). Sellepärast tulime arvamusele, et oksüdatiivse fosforüleerumise paremat seost homogenaati-

Fosfori ja hapniku neeldumise võime ja nende suhe aju homogenaadis

P μ g-des g/t		O μ g-des g/t		P:O	
Kontroll	Humisooliga	Kontroll	Humisooliga	Kontroll	Humisooliga
Katsed <i>in vivo</i>					
28,2	77,0	115,8	81,5	0,24	0,95
Katsed <i>in vitro</i>					
28,9	77,0	86,8	76,8	0,33	1,0

des humisooli toimel võib seletada ka ATF-i resünteerimisprotsessi kindlustamisega. Lähemaid andmeid nende mehhanismide olemuse kohta võib tuua ainult nende edasine uurimine.

Oma järelduste kontrollimiseks uurisime humisooli ja türoksiini koostoitmet. Hormoonile türoksiinile on teatavasti omane kudedes oksüdatiivset fosforüleerumist lahutada ja selle tulemusena suurendada kudede hingamist ja ainevahetust (Martius jt., 1955). Kuuele küülikule, kes 30 päeva jooksul iga päev said nahaalusi 1 ml humisooli lahjenduses 1 : 100, süstisime 11.—15. ja 26.—30. katsepäevani iga päev 1 mg türoksiini. Kontrollküülikud said türoksiini ainult viiel päeval — kokku 5 mg. Nagu näitavad joonisel esitatud katse- ja kontrollküülikute kehakaalu muutuste summeeritud kõverad, langes kehakaal esimestel viiepäevase türoksiinikuuri toimel 14. katsepäevaks 20%. Kahel küülikul langes kehakaal isegi 30% ja nad surid 15. katsepäeval südametoksi-koosi nähtudega.



Humisooli mõju türoksiinist tingitud kehakaalu langusele küülikutel.

I seeria — küülikud, kes said ainult türoksiini;

II seeria — küülikud, kes said türoksiini koos humisooliga.

seks humisooliga. Kuna türoksiini toime põhimomendiks, mis kutsus esile kehakaalu languse, on oksüdatiivse fosforüleerumise lahutamine, siis on tõenäoline, et humisooli kaitsemehhanism türoksiini suhtes seisnebki fosforüleerumise ja hingamise tugevdamises.

Väga huvitavaks osutusid ka viimaste katsete järelperioodi tähelepanekud küülikute kehakaalu muutuse kohta. Sellal kui ainuüksi türoksiini saanud küülikud jäid katsete järelperioodil kõhnadeks ja närusteks, võtsid humisoolikuuri foonil türoksiiniga süstitud katseloomad kehakaalus tublisti juurde, nägid väga head välja ja olid läikiva karvaga. Üksnes humisoolikuuriga selliseid muutusi kunagi ei saavutatud. Seega tekivad eksogeense türoksiini ja humisooli koostoitmel organismis täiesti erilaadsed ainevahetuse nihked, mis katsete järelperioodil põhjustavad loomadel kehakaalu kiiret tõusu. Võimalik, et sellisel türoksiini ja humisooli koostoitmel on suur tähtsus loomakasvatuses produktiivsuse tõstmise abinõuna.

Kokkuvõte

Humisooli parenteraalne manustamine valgetele hiirtele tugevdab nende aju homogenaatides oksüdatsiooni ja fosforüleerumise seost (P:O) kuni neljakordselt. Humisooli vahetul lisandamisel aju homogenaati suureneb P:O selles peaaegu samal määral.

Hiire aju homogenaadis on humisoolile omaseks oksüdatsiooni ja fos-

forüleerumise seost kaitsev toime, samuti võime neid juba lahutunud protsesse uuesti seostada või taastada. Humisooli toime eri aspektid aita- vad välja selgitada nii humisooli kui ka mudaravi toime mehhanisme.

Pikema humisoolikuuri foonil kaob süstetega manustatud türoksiini tugev kehakaalu vähendav toime küülikutel peaaegu täielikult.

KIRJANDUS

- Decsi L., Nádor K., 1958. Biochemische Grundlagen der zentralen ganglienlähmenden Wirkung. Arzneimittelforschung : 346—348.
- Martius C., Bieling H., Nitzlitzow D., 1955. Vergleich der Wirkung von Thyroxin auf den Grundumsatz und die Atmungskettenphosphorylierung. Biochem. Z. 327 : 163—169.
- Refabek J., 1962. The relation of humic acid to the control of stright growth of the plant cell. Symposion Humus and Plant. Prague.
- Keель Э., 1963. Новый лечебный препарат «Гумизоль», изготовленный из эстонской морской грязи. Труды по курортологии 1 : 19—27. (АН ЭССР). Таллин.
- Сибуль И., 1959. О действии препарата «Гумизоль» на центральную нервную систему и некоторые ферментные реакции. Тезисы докладов Республиканской научно-практической конференции терапевтов Эстонской ССР : 41—42. Таллин.
- Сибуль И., 1960. К механизму терапевтического действия препарата «Гумизоль». Тезисы докладов совещания по материалам апробации лечебного препарата «Гумизоль» : 15—16. Таллин.
- Сибуль И., 1961. К механизму терапевтического действия препарата «Гумизоль», изготовленного из эстонской морской лечебной грязи. Тр. Ин-та эксперим. медицины АН ЛитССР. Ревмагизм 2 : 277—284. Вильнюс.
- Сибуль И., 1963. Экспериментальные данные к механизму лечебного действия гумизоля. Труды по курортологии 1 : 38—49 (АН ЭССР). Таллин.
- Скулачев В. П., 1962. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. (АН СССР). М.

Tartu Riiklik Ülikool

Saabus toimetusse
16. III 1966

И. СИБУЛЬ

УКРЕПЛЕНИЕ СОПРЯЖЕННОСТИ ФОСФОРИЛИРОВАНИЯ И ДЫХАНИЯ В МОЗГУ ПРИ ПОМОЩИ ПРЕПАРАТА «ГУМИЗОЛЬ»*

Резюме

Проведенные нами ранее исследования выявили (Сибуль, 1960, 1961, 1963), что выделенный из эстонской морской лечебной грязи богатый гуминовыми кислотами экстракт в виде препарата «Гумизоль» при парентеральном введении его белым мышам угнетает аденозинтрифосфатазу (АТФ-аза) и ацетилхолинэстеразу мозга, продлевает время проживания спинно-мозговых препаратов лягушек и в известной мере стимулирует их рефлекторную деятельность, установленную способом Тюрка (Сибуль, 1953, 1961). В данной работе изучалось действие гумизоля на сопряженность фосфорилирования с дыханием в гомогенатах мозга белых мышей.

Подопытным животным за 16 часов до начала исследования вводили подкожно 1 мл гумизоля, разведенного физиологическим раствором хлористого натрия в отношении 1 : 100, а контрольным животным — только физиологический раствор в таком же количестве. При умерщвлении мышей немедленно отделяли мозг и на льду изготовляли гомогенаты, после чего в аппарате Варбурга сразу же определяли их способность к поглощению кислорода и неорганического фосфора.

Выяснилось, что под действием гумизоля способность гомогенатов к поглощению фосфора по сравнению с контролем увеличивается почти в три раза, а к поглощению кислорода снижается незначительно. При этом Р : О как показатель степе-

* Работа выполнена в Эстонском институте экспериментальной и клинической медицины АМН СССР в 1962 г.

ни сопряжения процессов окислительного фосфорилирования повышается примерно в четыре раза.

В опытах *in vitro* с добавлением экстракта грязи непосредственно в гомогенаты мозга выявились результаты, подобные *in vivo*. Это доказывает, что гумизоль не только предохраняет сопряженность дыхания с фосфорилированием от разобщения, но может и восстановить его, если оно уже разобщено. Более тонкие механизмы выявленного действия гумизола требуют, однако, дальнейшего, более углубленного изучения.

С целью проверки вышесказанного предположения нами изучалось влияние гумизола на действие тироксина, введенного в целостный организм. Было установлено, что на фоне ежедневных введений гумизола почти полностью снимается понижающее все кроликов действие пятикратного введения тироксина (по 1 мг). Весьма вероятно, что это затормаживающее влияние гумизола на действие экзогенного тироксина в целостном организме объясняется предохранением от разобщения сопряженности дыхания и фосфорилирования.

Тартуский государственный университет

Поступила в редакцию
16/III 1966

I. SIBUL

ÜBER DIE SCHUTZWIRKUNG DES PRÄPARATES «HUMISOL» DER ENTKOPPELUNG DER OXIDATIVEN PHOSPHORILIERUNG GEGENÜBER*

Zusammenfassung

In den ersten Mitteilungen (Sibul, 1960, 1961, 1963) ist gezeigt worden, dass ein huminsäurereiches Extrakt des estnischen Meer-Heilschlammes in der Art des Präparates «Humisol» bei den Versuchstieren nach parenteraler Verabreichung eine deutliche Hemmung der Adenosintriphosphatase (ATP-ase) und der Azetylcholinesterase in Gehirnhomogenaten verursacht. Ausserdem wurde an Rückenmarkreflexpräparaten des Frosches festgestellt, dass die vorhergehende Verabreichung des Humisols eine gesteigerte chemorezeptorische Empfindlichkeit, eine verkürzte Reflexzeit und eine verlängerte Lebensdauer der Präparate zur Folge hat.

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse unserer Untersuchungen über die Wirkung des Humisols auf die oxidative Phosphorilierung von Gehirnhomogenaten der weissen Maus geschildert. Bei diesen Versuchen, die nach methodischen Vorschriften von Decsi und Nádor (1958) ausgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass das Präparat nach parenteraler Verabreichung den Versuchstieren, aber auch beim direkten Hinzufügen ins Homogenat eine fast dreifache Erhöhung der Aufnahme des anorganischen Phosphates bei einer sehr mässig verminderten Sauerstoffaufnahme verursacht. Daraus wurde der Schluss gezogen, dass das untersuchte Heilschlammpräparat imstande ist, der Entkoppelung der oxidativen Phosphorilierung gegenüber eine ausgezeichnete Schutzwirkung zu leisten, was in 3—4fach erhöhten P:O Werten zum Ausdruck kam. Augenscheinlich war Humisol auch imstande, eine entkoppelte oxidative Phosphorilierung neu zu verbinden.

Um darüber eine Aufklärung zu erhalten, ob Humisol der Entkoppelung der oxidativen Phosphorilierung gegenüber auch im ganzen Organismus eine Schutzwirkung ausübt, wurden beim Kaninchen noch Versuche über das Zusammenwirken von Humisol und Thyroxin angestellt. Es wurde eindeutig nachgewiesen, dass Humisol bei diesem Zusammenwirken imstande ist, die ausgeprägte gewichtsabnehmende Wirkung des Thyroxins zu annullieren oder auszuschliessen. Dieses Ergebnis bekräftigte stark die Schlussfolgerung, dass Humisol auch im ganzen Organismus die Koppelung der oxidativen Phosphorilierung fördert.

Tartuer Staatsuniversität

Eingegangen
am 16. März 1966

* Die Arbeit wurde im Estnischen Institut für Experimentelle und Klinische Medizin im Jahre 1962 ausgeführt.