

Х. НОРМАН

ВЛИЯНИЕ ГУМИЗОЛЯ НА АКТИВНОСТЬ ЛЕГКОРАСТВОРИМОЙ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ МЫШЕЧНЫХ ТКАНЕЙ

Из данных литературы известно, что при введении в организм полученного из эстонской морской грязи лечебного препарата гумизоля происходит снижение активности аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы) в ткани мозга у белых мышей (Сибуль, 1963) и в эритроцитах у кроликов (Сибуль, Кильдема, 1965). Это действие проявлялось как в опытах *in vivo*, так и *in vitro*. Влияние гумизоля на активность АТФ-азы мышечной ткани оставалось неизученным. Тем не менее этот вопрос представляет большой интерес.

Известно, что в мышечной ткани значительная часть АТФ-азы связана с миозином и имеет непосредственное отношение к сократительной деятельности мышц. Помимо этого, АТФ-аза содержится также в саркомерах, являющихся центрами многих процессов обмена веществ.

Встречаются указания, что при некоторых гормональных нарушениях реакция организма на введение гумизоля изменяется (Норман, 1965; Норман, 1966; Sui, 1964). С другой же стороны известно, что гормональные сдвиги оказывают определенное воздействие на активность АТФ-азы некоторых мышечных тканей (Медовар, 1957; Kochakian и др., 1954).

Исходя из сказанного, было решено исследовать влияние гумизоля на активность АТФ-азы мышечных тканей диафрагмы и сердца при нормальных условиях, при экспериментальном тиреотоксикозе и при добавочном введении в организм небольшого количества инсулина.

Методика

Опыты осуществлялись на 69 белых крысах-самках весом 170—250 г. Из них 13 крысам искусственно скармливали в течение 40—45 дней тиреоидин по 100 мг/100 г, что вызывало у них слабый тиреотоксикоз.

У здоровых животных АТФ-азная активность в тканях диафрагмы и сердечной мышцы определялась после 10, 20 и 30 инъекций гумизоля, а у тиреотоксикозных животных только после 10 инъекций гумизоля. Тиреотоксикозным животным начинали вводить гумизоль после 30—35-дневного скармливания тиреоидина.

Гумизоль вводился внутримышечно один раз в сутки в количестве, соответствующем обычной терапевтической дозе (0,3 мл гумизоля 1:100 на 100 г веса тела) (Норман, 1963). Контрольные животные гумизоля не получали.

Здоровые животные (опытные и контрольные) были разделены на две группы: одной из них за полчаса до опыта вводился инсулин (2 ед/кг), другой инсулин не вводился. Каждая исследованная группа состояла из 5—8 животных.

Определялась активность АТФ-азы легкорастворимых мышечных белков, то есть белков, растворимых в солевом растворе с низкой ионной силой. Методика определения активности фермента была заимствована в основном из работы И. Збарского и Н. Брискер (1948).

Показателем активности фермента служило нарастание неорганического фосфора в инкубационной среде за 30 мин при 37°. Инкубируемая смесь состояла из боратного буфера (рН 7,0), АТФ, $MgCl_2$ и гомогената ткани.

Ткани измельчали на холоду кварцевым песком и гомогенизировали с 0,03М раствором КСl на 50 мг ткани брали 1 мл раствора КСl). Для освобождения от примеси песка и крупных частиц смесь центрифугировали в течение 2 мин при 1000 об/мин.

По истечении срока инкубации белки осаждали равным объемом 8%-ного раствора трихлоруксусной кислоты и в растворе определяли неорганический фосфор. С этой целью к 1 мл центрифугата прибавляли 1 мл изобутиленового спирта и 0,2 мл 5%-ного раствора молибденовокислого аммония в 4н. H_2SO_4 . Смесь встряхивали в течение 30 сек и давали отстояться. Затем 0,1 мл изобутанолового экстракта переносили в 10 мл подкисленного этилового спирта (1 мл концентрированной H_2SO_4 на 100 мл спирта) и после добавления 0,2 мл раствора двухлористого олова (в концентрированной HCl) колориметрировали. Концентрацию фосфора находили по градуировочной кривой.

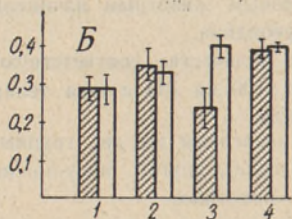
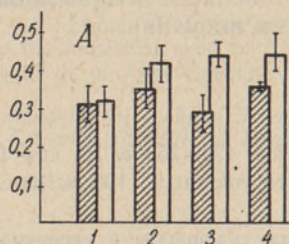
Активность АТФ-азы рассчитывалась на азот белка, который определялся в трихлоруксусном осадке после минерализации либо йодометрическим методом Энгельгарта и Любимовой (Фердман, 1957), либо колориметрическим способом Коварского (Петрунькина, 1961).

Выражалась активность АТФ-азы в миллиграммах фосфора на 1 мг азота белка. Полученные данные обрабатывались по методу вариационной статистики (Каминский, 1964).

Результаты исследований

Влияние гумизоля на активность АТФ-азы в гомогенатах диафрагмы и сердечной мышцы у исследованных животных в нормальных условиях и после введения инсулина показано на рис. 1.

Опыты показали, что в нормальных условиях после 10 и 20 инъекций гумизоля активность АТФ-азы в гомогенатах исследованных мышечных тканей существенно не изменилась. После 30 инъекций гумизоля наблюдалось заметное повышение активности АТФ-азы в сердечной мышце, в то время как в диафрагме отмечалась лишь незначительная тенденция к этому.



У тех животных, которым незадолго до опыта был введен инсулин, сдвиги к активности АТФ-азы после введения гумизоля обнаруживались несколько раньше. Так, в диафрагме небольшая тенденция к повышению активности фермента имела уже после 10 инъекций гумизоля, а после 20 инъекций это повышение стало совершенно определенным. При этом разница была статистически достоверной ($P < 0,05$) по сравнению с контрольными животными и с животными, получавшими один гумизолю. По-

Рис. 1. Активность АТФ-азы в диафрагме (А) и сердечной мышце (Б) белых крыс: I — контроль, II — после 10 инъекций гумизоля, III — после 20 инъекций гумизоля, IV — после 30 инъекций гумизоля.

Заштрихованные столбики — в нормальных условиях, незаштрихованные — после добавочного введения инсулина. I средняя ошибка (m).

сле 30 инъекций гумизоля эта разница по сравнению с указанными группами была недостоверной ($P > 0,05$).

Отмеченные сдвиги можно отнести за счет гумизоля, так как один инсулин их не вызывал.

В сердечной мышце добавочное введение инсулина после 20 инъекций гумизоля также способствовало повышению активности АТФ-азы. Правда, разница при этом была статистически достоверной ($P < 0,05$) лишь с той группой животных, которой вводился один гумизоляр. Однако после 30 инъекций гумизоля наблюдалось повышение активности фермента ($P < 0,05$) только по сравнению с контрольными животными.

Таким образом, как при добавочном введении инсулина, так и при нормальных условиях сдвиги в активности АТФ-азы исследованных мышечных тканей были направлены во всех случаях в сторону повышения и проявились отчетливее при более длительном введении гумизоля (после 20—30 инъекций).

Переходя к изложению результатов исследования тех животных, которые получали тиреоидин, следует заметить, что у подопытных животных тиреотоксикоз был развит сравнительно слабо, на что указывали незначительные отклонения веса тела и сравнительно малая гипертрофия сердечной мышцы.

Средние показатели активности АТФ-азы гомогенатов диафрагмы и сердечной мышцы, выявленные при исследовании животных, получавших тиреоидин, изображены на рис. 2.

В опытах этой серии белковый азот определяется по другой методике и его содержание в

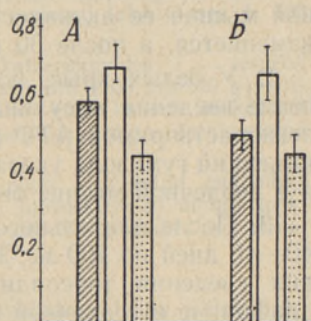


Рис. 2. Активность АТФ-азы в диафрагме (А) и сердечной мышце (Б) белых крыс: I — контроль, II — после введения тиреоидина, III — после введения тиреоидина и 10 инъекций гумизоля. I средняя ошибка (m).

гомогенатах исследованных тканей было ниже, в связи с чем показатели активности АТФ-азы оказались выше, чем в опытах предыдущей серии.

Как видно из рис. 2, у тиреотоксикозных животных активность АТФ-азы в диафрагме и в сердечной мышце по сравнению со здоровыми (контрольными) животными была несколько повышена, хотя статистически это не подтверждалось ($P > 0,05$).

После 10 инъекций гумизоля активность АТФ-азы у животных, получавших тиреоидин, в диафрагме заметно снизилась ($P < 0,01$) и стала даже ниже, чем у здоровых животных ($P < 0,05$). В сердечной мышце тоже наблюдалось снижение активности АТФ-азы ($P < 0,05$), однако статистически достоверной разницы со здоровыми животными здесь отметить не удалось.

Обсуждение результатов исследования

Проведенные исследования показали, что в нормальных условиях гумизоляр оказывал влияние на АТФ-азную активность только в сердечной мышце и лишь при длительном применении препарата. На АТФ-азную активность диафрагмы же он почти не влиял. Это позволяет думать, что гумизоляр в использованных дозах не оказывает прямого действия на исследованный фермент. Сдвиги, обнаруженные в сердечной мышце после 30 инъекций гумизоля, имеют, по всей вероятности, вторичный характер и связаны, очевидно, с изменением нейрогуморальной регуляции.

Последнее находит подтверждение в опытах с инсулином и тиреоидином, которые показали, что влияние гумизола на АТФ-азную активность сердечной мышцы значительно ускорилось после введения за полчаса до опыта небольшой дозы инсулина. Инсулин способствовал также повышению активности АТФ-азы в диафрагме после 20 инъекций гумизола, чего в нормальных условиях не наблюдалось.

У животных, получавших тиреоидин, было отмечено значительное снижение АТФ-азной активности гомогенатов мышечных тканей диафрагмы и сердца после 10 инъекций гумизола. Когда же вводился один тиреоидин, наблюдалась, наоборот, тенденция к повышению активности фермента.

Все эти факты говорят в пользу того, что влияние гумизола на АТФ-азную активность исследованных тканей связано с гормональными воздействиями на тканевый обмен.

Выводы

1. В нормальных условиях после 10, 20 и 30 инъекций гумизола (по 0,3 мл гумизола 1 : 100 на 100 г веса тела) активность легкорастворимой АТФ-азы в диафрагме белых крыс существенно не изменяется. В сердечной мышце ее активность после 10 и 20 инъекций гумизола также не изменяется, а после 30 инъекций повышается.

2. У белых крыс, получивших 20 инъекций гумизола, через полчаса после введения инсулина (2 ед./кг) наблюдается повышение активности легкорастворимой АТФ-азы в диафрагме и сердечной мышце. После 30 инъекций гумизола указанных сдвигов в диафрагме больше не отмечается, а в сердечной мышце они почти такие же, как без введения инсулина.

3. После длительного введения белым крысам тиреоидина (в течение 40—45 дней по 100 мг/100 г) и 10 инъекций гумизола (начиная с 30—35 дня введения тиреоидина) активность легкорастворимой АТФ-азы в диафрагме и сердечной мышце уменьшается.

4. Влияние гумизола на АТФ-азную активность мышечной ткани связано, очевидно, с гормональными воздействиями на тканевый обмен.

ЛИТЕРАТУРА

- Збарский И. Б., Брискер Н. А., 1948. Водорастворимая аденозинтрифосфатаза нормальных и злокачественных тканей. Биохимия 13 (2) : 185—192.
- Каминский Л. С., 1964. Статистическая обработка лабораторных и клинических данных. Л.
- Медовар Е. Н., 1957. Биохимические процессы в сердечной мышце при Е-авитаминозе и гипертиреозе. Автореф. дисс. канд. биол. н. Киев.
- Норман Х. К., 1963. О действии гумизола на фосфорный и кальциевый обмен некоторых тканей в эксперименте. В сб.: Труды по курортологии 1 : 50—61. Таллин. (Изд. АН ЭССР).
- Норман Х., 1965. Влияние гумизола на фосфорный обмен сердечной мышцы. Изв. АН ЭССР, Сер. биол. 14 (2) : 277—283.
- Норман Х. К., 1966. Влияние гумизола на активность мышечной гексокиназы. В сб.: Труды по курортологии 3. (В печати).
- Петрунькина А. М., 1961. Практическая биохимия. Л.
- Сибуль И. К., 1963. Экспериментальные данные к механизму лечебного действия гумизола. В сб.: Труды по курортологии 1 : 38—49. Таллин. (Изд. АН ЭССР).
- Сибуль И. К., Кильдема Л. А., 1965. О действии гумизола на активность аденозинтрифосфатазы и гексокиназы эритроцитов. Материалы Второй биохимической конференции прибалтийских республик и Белорусской ССР : 419—420. Рига.

- Ferdman D. L., Sopin E. Ф., 1957. Практикум по биологической химии. М.
 Kochakian C. D., Reed B. A., Eischeid A. M., 1954. Changes in tissue weights and enzymes produced by thyroidectomy and testosterone. Amer. J. Physiol. 177 (3) : 413—417.
 Sui V., 1964. Humisooli toimest tervetesse ja eksperimentaalse hüpertüreoosiga valgetesse hiirtesse. ENSV TA Toimet., Biol. Seeria 13 (4) : 348—352.

Эстонский институт экспериментальной
 и клинической медицины
 Академии медицинских наук СССР

Поступила в редакцию
 15/XII 1965

H NORMAN

HUMISOOLI TOIME LIHASKUDEDE KERGESTI LAHUSTUVA ADENOSIINTRIFOSFATAASI AKTIIVSUSESSE

Resümee

Uuriti eesti meremudast saadud preparaadi humisooli toimet kergesti lahustuva adenosintriifosfataasi (ATF-aasi) aktiivsusesse valgete rottide diafragmas ja südamelihases. Humisooli manustati terapeutilistes annustes (0,3 ml humisooli lahjenduses 1:100 100 g kehakaalu kohta).

ATF-aasi aktiivsust määrati järgmistes valgete rottide katserühmades: I — tervetel rottidel (humisooli süstimata), II — pärast humisooli või türeoidiini (100 mg/100 g) korduvat manustamist, III — pärast insuliini (2 Ü/kg pool tundi enne katset) ühekordset manustamist, IV — türeoidiini või insuliini manustamisel koos humisooliga ülalnimetatud annustes.

ATF-aasi aktiivsus määrati peamiselt Zbarski-Briskeri poolt kirjeldatud meetodika järgi. Fermendi aktiivsuse näitajaks oli anorgaanilise fosfori juurdekasv 30 minuti jooksul 37°C juures inkubatsioonikeskkonnas, mis sisaldas fermentipreparaati (koehomogenaati), adenosintriifosforhapet, MgCl₂ ja boraatpuhvrit (pH 7).

Anorgaaniline fosfor määrati kolorimeetriliselt.

ATF-aasi aktiivsust väljendati fosforihulgana (milligrammides) 1 mg valgu lämmastiku kohta, mida määrati kas Engelharti ja Ljubimova jodomeetrilise meetodiga või Kovarski kolorimeetrilise meetodiga.

Eksperimentaalne materjal töötati läbi variatsioonstatistiliselt.

Uurimised näitasid, et katseloomadel ei muutunud kergesti lahustuva ATF-aasi aktiivsus diafragmas oluliselt pärast 10., 20. ja 30. humisoolisüstet. Samuti ei muutunud ATF-aasi aktiivsus südamelihases pärast 10. ja 20. humisoolisüstet, kuid pärast 30. süstet suurenes tunduvalt.

Neil juhtudel, kui enne katset manustati insuliini, täheldati pärast 20. humisoolisüstet ATF-aasi aktiivsuse tõusu nii südamelihases kui ka diafragmas. Pärast 30. humisoolisüstet diafragmas nihkeid ei esinenud, kuid südamelihases olid nad peaaegu samasugused kui insuliinita juhtudel.

Nendel loomadel, kes said pikemat aega türeoidiini, vähenes ATF-aasi aktiivsus uuritud kudedes tunduvalt pärast 10. humisoolisüstet.

Esitatud andmete põhjal võib arvata, et humisooli toime lihaskoe ATF-aasi aktiivsusesse on seotud nähtavasti hormonaalse toimega kudede ainevahetusesse.

NSV Liidu Meditsiiniteaduste Akadeemia
 Eesti Eksperimentaalse ja Kliinilise Meditsiini Instituut

Saabus toimetusse
 15. XII 1965

THE EFFECT OF HUMISOL ON THE ACTIVITY OF EASILY SOLUBLE ADENOSINTRIPHOSPHATASE OF MUSCLE TISSUES

Summary

The effect of Humisol, a preparation of Estonian curative sea-mud, upon the easily soluble adenosintriphosphatase (ATP-ase) activity of the diaphragm and heart muscle was investigated in white rats. Humisol was administered in therapeutic doses (0.3 ml of Humisol in a solution of 1:100 per 100 g of body weight).

The ATP-ase activity was stated in the following test groups: I — healthy rats (non-injected with Humisol), II — after repeated injections of Humisol and thyreoidine (100 mg/100 g), III — after a single dosis of insulin (2 μ /kg, half an hour before the test), IV — after an injection of thyreoidine or insulin with Humisol in before-mentioned doses.

The ATP-ase activity was studied mainly according to the method devised by Zbarski-Brisker. The activity of the ferment was established on the basis of the increase of anorganic phosphorus within 30 minutes at 37° C, in an incubation medium containing a ferment preparation (tissue homogenate), ATP, MgCl₂ and borate buffer (pH 7).

Anorganic phosphorus was determined colorimetrically.

The ATP-ase activity was expressed as the amount of phosphorus (in milligrams) per 1 mg of protein nitrogen, which was determined either by the iodometric method of Engelhart and Lyubimova, or by the colorimetric method of Kovarski.

The experimental data were calculated by variation-statistical methods.

The studies showed that the easily soluble ATP-ase activity of the diaphragm of the experimental animals did not change to a considerable extent after the 10th, 20th and 30th injections of Humisol. In the heart muscle, however, the ATP-ase activity did not change after the 10th and 20th Humisol injections either, but after the 30th it increased considerably.

In those cases when insulin was administered prior to the experiment, the ATP-ase activity increased both in the heart muscle and diaphragm after the 20th Humisol injection. There were no further changes in the diaphragm after the 30th Humisol injection, but in the heart muscle they were about the same as in the cases without insulin.

The animals treated with thyreoidine for a prolonged period, revealed a pronounced decrease in the ATP-ase activity in the tissues examined after the 10th Humisol injection.

The obtained data allow to conclude that the effect of Humisol on the ATP-ase activity of muscle tissues is evidently connected with a hormonal influence upon tissue metabolism.

*Academy of Medical Sciences of the USSR,
Estonian Institute of Experimental and Clinical Medicine*

Received
Dec. 15, 1965