

L. KILDEMA

HUMISOOLI TOIMEST VERERAKKUDE HEKSOKINAASI AKTIIVSUSESSE

Kirjanduses leidub vähe teateid humisooli toime kohta organismi süsi-
vesikute ainevahetuses. I. Sibula andmeil (Сибуль, 1961) põhjustab humi-
sool roti aju heksokinaasi aktiivsuses muutusi. Et heksokinaasil on suhk-
rute glükolüütilisel lagunemisel organismis oluline tähtsus, siis pakub huvi
uurida selle fermenti aktiivsust humisooli pikaajalisel manustamisel.

Käesolevas töös uuriti humisooli väikeste annuste toimet erütrotsüütide
ja leukotsüütide heksokinaasi aktiivsusesse tervetel küülikutel korduva
manustamise puhul. Ühtlasi jälgiti katseloomadel muutusi veresuhkru-
sisalduses.

Metoodika

Katsed korraldati kahes seerias, kokku 16 küülikuga. Neile manustati 20 päeva väl-
tel intramuskulaarselt üks kord päevas naatriumkloriidi isotoonilises lahuses 0,25 ml/kg
humisooli lahjenduses 1:100.

Esimeses katseseerias (9 küülikut) määrati leukotsüütide heksokinaasi aktiivsus. See
toimus enne humisooli manustamist, 10. ja 20. katsepäeval ning 10. päeval pärast viimast
preparaadi süstimist.

Teises katseseerias (7 küülikut) määrati erütrotsüütide heksokinaasi aktiivsus, ja
nimelt: enne humisooli manustamist ning 5., 10. ja 20. katsepäeval. Samadel tähtaegadel
määrati katseloomadel ka veresuhkruisisaldus.

Vere rakkelementide saamiseks kasutati katselooma kõrvaveenist võetud verd.

Leukotsüüdid eraldati verest Teodorovitši meetodil (Теодорович, 1958), kusjuures
nende sedimentatsiooni soodustamiseks lisati verele želatiinilahust. Katseiks kasutati
intaktsete leukotsüütide suspensiooni naatriumkloriidi isotoonilises lahuses.

Erütrotsüütide heksokinaasi aktiivsust määrati hemolüsaatides, kusjuures veri eelne-
valt stabiliseeriti hepariiniga. Hemolüsaatide valmistamise meetodikat on varem kirjelda-
tud (Кильдема, 1960).

Heksokinaasi aktiivsust määrati glükoosi hulga vähenemise alusel inkubatsioonisegus.
Põhiliselt kasutati W. R. Christenseni, C. H. Plimptoni ja E. G. Balli (1949) poolt soovi-
tatud inkubatsioonisegu, milles üksikute komponentide kontsentratsiooni kohandati käes-
oleva töö tingimustele. Kasutatud inkubatsioonisegu koostis oli: NaHCO_3 — 0,049M,
 MgCl_2 — 0,024M, ATF — 0,039M, NaF — 0,024M, glükoos — 0,0013M. Inkubatsioonisegu
üldhulk oli 2,05 ml, millest leukotsüütide suspensioon või erütrotsüütide hemolüsaat moo-
custas 1,0 ml. Inkubeeriti 60 min. 37° C temperatuuril. Pärast inkubatsiooniaja möödu-
mist katkestati fermentatiivne reaktsioon CdSO_4 -lahuse lisamisega. Pärast valkude sades-
tamist ja filtreerimist määrati filtraadis glükoosisisaldus Hagedorni-Jenseni (1923) järgi.

Inkubatsiooni kestel fosforüleeritud glükoosi hulk (*resp.* vaba glükoosi hulga vähe-
nemine) arvatati glükoosisisalduse diferentsi põhjal inkubatsioonisegus enne ja pärast

inkubeerimist. Et leukotsüütide puhul oli tegemist intaktsete rakkudega, siis otsustati nende aktiivsuse üle glükoosi utilisatsiooni intensiivsuse järgi. Heksokinaasi aktiivsust väljendati järgmiselt: leukotsüütide puhul — glükoosi hulk mikrogrammides $1 \cdot 10^6$ leukotsüüdi kohta; erütrotsüütide hemolüsaatides — glükoosi hulk mikrogrammides hemoglobiini keskmise sisalduse (96 mg Hb) kohta proovis.

Veresuhkrisisaldust määrati Hagedorni-Jenseni meetodil, kusjuures valgud sadestati CdSO_4 -ga.

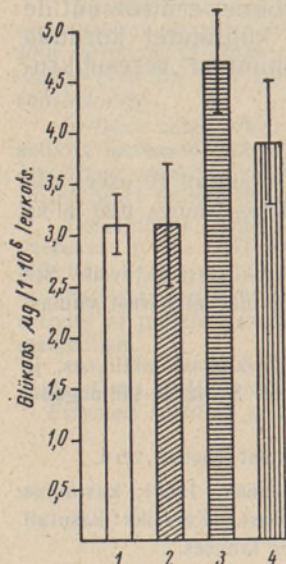
Katseandmete tõenäosuse hindamisel kasutati *t*-testi (Фишер, 1958). Nullhüpotees loeti mittetõenäoliseks, kui ta väärtus $P_{\text{diff}} < 0,05$.

Katsetulemused ja nende arutelu

I katseseeria. Katsetulemustest selgus, et humisooli korduv manustamine põhjustab leukotsüütides ajutist glükoosi utilisatsiooni tõusu (joon. 1). Kõige selgemini väljendus see humisooli manustamise perioodi lõpul, s. o. 20. katsepäeval, millal glükoosi utilisatsiooni keskmine näitaja oli tõusnud 42% ($3,1 \pm 0,3 \mu\text{g}/1 \cdot 10^6$ leukotsüüdit katseperioodi algul $4,7 \pm 0,5 \mu\text{g}/1 \cdot 10^6$ leukotsüüdile 20. katsepäeval), kusjuures muutumise tõenäosus $P_{\text{diff}} < 0,1 > 0,05$. Võib mainida, et individuaalsed glükoosi utilisatsiooni näitajad tõusid seitsmel katseloomal üheksast 9–63%. 10. päeval pärast humisooli viimast manustamist võis täheldada glükoosi utilisatsioonis normaliseerumistendentsi (keskmine näitaja $3,9 \pm 0,6 \mu\text{g}/1 \cdot 10^6$ leukotsüüti). Selle põhjal võib arvata, et glükoosi utilisatsiooni intensiivistumine humisooli toimel on lühiajaline.

Et humisooli toimel arenenud muutused leukotsüütide heksokinaasi aktiivsuses (*resp.* glükoosi utilisatsioonis) olid ilmsed, kuid nende tõepärasus üksiknäitajate varieerumise tõttu polnud eriti suur ($P_{\text{diff}} < 0,1 > 0,05$), siis otsustati korraldada analoogiline katseseeria ka erütrotsüütidega. Sellega taotleti täpsemalt välja selgitada, kas humisool põhjustab kindlasuunalisi tõepäraseid muutusi vererakkude glükolüüsiprotsessides.

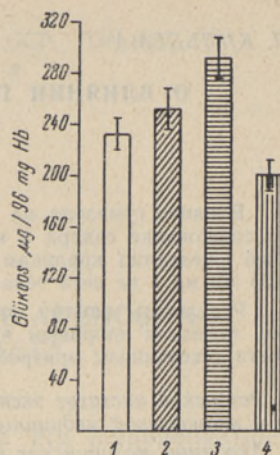
Joon. 1. Humisooli toime küüliku leukotsüütide heksokinaasi aktiivsusesse: 1 — enne humisooli manustamist, 2 — 10. katsepäeval, 3 — 20. katsepäeval, 4 — 10. päeval pärast viimast humisooli manustamist.



II katseseeria. Teisest katseseeriast selgus, et humisooli korduv manustamisel tõuseb küülikutel ka erütrotsüütide heksokinaasi aktiivsus (joon. 2). Eriti selgesti ilmnes see 10. katsepäeval, millal fermendi keskmine aktiivsus oli tõusnud 24% ($234 \pm 13 \mu\text{g}/96$ mg Hb enne katse algust, $291 \pm 11 \mu\text{g}/96$ mg Hb 10. katsepäeval, $P_{\text{diff}} < 0,05$). Individuaalsed heksokinaasi aktiivsuse näitajad tõusid humisooli manustamise ajal kõikidel küülikutel 3–32% võrra. Katseperioodi lõpuks langes heksokinaasi aktiivsus isegi veidi alla lähtenivoo ($201 \pm 11 \mu\text{g}/96$ mg Hb).

Et erütrotsüütide heksokinaasi aktiivsuse ja leukotsüütide glükoosi utilisatsiooni tõusu ei täheldatud kohe, vaid alles pärast korduvat humisooli manustamist, võib selle põhjal oletada, et humisooli toime heksokinaasi reaktsioonile pole otsene, vaid toimub teiste biokeemiliste reaktsioonide kaudu, mis omakorda viivad glükolüüsiprotsesside intensiivistumisele

Joon. 2. Humisooli toime küüliku erütrotsüütide heksokinaasi aktiivsusesse: 1 — enne humisooli manustamist, 2 — 5. katsepäeval, 3 — 10. katsepäeval, 4 — 20. katsepäeval.



vererakkudes. Seda kinnitavad ka andmed, et humisool *in vitro* tingimustes ei avaldanud toimet erütrotsüütide heksokinaasi aktiivsusesse.

Veresuhkrusisaldus (mg⁰/₁₀₀) küülikutel humisooli manustamise puhul

	Kontroll	5-ndal	10-ndal	20-ndal
		katsepäeval		
Katsete arv	7	7	7	7
$M \pm m$	96 ± 4	110 ± 8	106 ± 7	92 ± 7
P	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
P_{dif}	—	>0,3	>0,5	>0,5

Veresuhkrusisalduses ei täheldatud olulisi muutusi humisooli manustamise vältel (vt. tabel). Mõningane veresuhkrusisalduse tõus esines küll 5. katsepäeval, kuid see ei osutunud statistiliselt tõenäoliseks ($P_{dif} < 0,1$).

Resümeerides meie katsete tulemusi, võib öelda, et humisooli korduv manustamine väikestes annustes tõstab heksokinaasi aktiivsust vere rakk-elementides, kuid pärast preparaadi manustamist või isegi varem langeb see jälle. Võrreldes käesolevas töös noteeritud veresuhkrusisalduse näitajaid vererakkude heksokinaasi aktiivsusega, võib märkida, et viimane reageerib humisooli toimele tundlikumalt. Võib arvata, et humisool kutsub organismis esile lühiajalise glükolüütiliste protsesside intensiivistumise, mis peegeldub ka vererakkude heksokinaasi aktiivsuse muutustes.

Kokkuvõte

1. Humisooli manustamisel väikestes annustes pikema aja vältel tõuseb küülikutel ajutiselt erütrotsüütide ja leukotsüütide heksokinaasi aktiivsus, mis pärast preparaadi manustamise lõpetamist langeb endisele tasemele.

2. Väikeste humisooliannuste kasutamisel ei ilmne küülikutel olulisi muutusi veresuhkrusisalduses.

KIRJANDUS

- Christensen W. R., Plimpton C. H., Ball E. G., 1949. The hexokinase of the rat erythrocyte and the influence of hormonal and other factors on its activity. *J. Biol. Chem.* **180** (2) : 791—802.
- Hagedorn H. C., Jensen B. N., 1923. (Tsit. Goetze E., 1959. Einrichtung und Methoden des klinischen Laboratoriums : 155—157. Jena.)
- Кильдема Л. А., 1960. Об активности гексокиназы эритроцитов и воздействии на нее инсулина и кортизона. *Изв. АН ЭССР, Серия биол.* **9** (3) : 232—240.
- Теодорович В. И., 1958. Методика выделения лейкоцитов и тромбоцитов. *Акт. вopr. перелив. крови* **6** : 309—312.
- Сибуль И. К., 1961. К механизму терапевтического действия препарата «Гумизоль», изготовленного из эстонской морской лечебной грязи. *Ревматизм II, Тр. ин-та эксперим. мед. АН ЛитССР* **7** : 277—284.
- Фишер Р. А., 1958. Статистические методы для исследователей. М.

Л. КИЛЬДЕМА

О ВЛИЯНИИ ГУМИЗОЛЯ НА АКТИВНОСТЬ ГЕКСОКИНАЗЫ КЛЕТОК КРОВИ

Резюме

Влияние гумизоля на активность гексокиназы эритроцитов и лейкоцитов, а также на содержание сахара в крови исследовали на 16 здоровых кроликах. В течение 20 дней ежедневно кроликам внутримышечно вводили гумизоль в разведении 1:100 по 0,25 мл на 1 кг веса тела.

Результаты опытов показали, что длительное и многократное введение небольших доз гумизоля здоровым кроликам приводит к временному повышению у них активности гексокиназы эритроцитов и лейкоцитов.

*Эстонский институт экспериментальной
и клинической медицины
Академии медицинских наук СССР*

Поступила в редакцию
27/1 1966

L. KILDEMA

ON THE EFFECT OF HUMISOL UPON THE HEXOKINASE ACTIVITY OF BLOOD CELLS

Summary

The effect of humisol on the hexokinase activity of erythrocytes and leucocytes and on the blood sugar level was studied in 16 healthy rabbits. Humisol was administered by intramuscular injection in a dilution 1:100 in a dose of 0.25 ml per 1 kg of body weight during 20 days.

Experiments have shown that in connection with a repeated administration of Humisol an increase in the hexokinase activity of erythrocytes and leucocytes is observed.

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

Received
Jan. 27, 1966