EESTI NSV TEADUSTE AKADEEMIA TOIMETISED. XV KÖIDE
BIOLOOGILINE SEERIA. 1966, Nr. 4

ИЗВЕСТИЯ АКАДЕМИИ НАУК ЭСТОНСКОЙ ССР. ТОМ XV
СЕРИЯ БИОЛОГИЧЕСКАЯ. 1966, № 4

https://doi.org/10.3176/biol.1966.4.15

L. TERAS

BIOFLAVONOIDIDE TOIMEST ADENOSIINTRIFOSFATAASI AKTIIVSUSESSE MAKSAKOE MITOKONDRITES

Vaatamata bioflavonoidide (P-vitamiini) laialdasele kasutamisele mitmesuguste haiguste ravis ja profülaktikas, pole nende toimemehhanism veel täiesti selge. Paljud uurijad rõhutavad, et bioflavonoidid mõjustavad kudedes oksüdatsiooniprotsesse (Böhm, Lamprecht, 1959; Запрометов, 1955; Курсанов, 1957 jt.). Meiegi varasemad tööd (Teras, 1962, 1965; Терас, 1965) näitavad, et bioflavonoidide (rutiini ja katehhiinide) toimel intensiivistub nii maksa- kui ka lihaskoe hingamine. Ühtlasi nähtus meie katsetest, et samaaegselt oksüdatsiooniga mõjustavad bioflavonoidid ka fosforüleerumisprotsesse. Nimelt võis maksakoe mitokondreid 60 minuti vältel 2° C temperatuuris bioflavonoididega mõjustades täheldada oksüdatiivse fosforüleerumise tunduvat langust. Samasugune toime ilmnes *in vivo,* millal nii rutiini kui ka katehhiinide parenteraalne manustamine põhjustas mitokondrites oksüdatiivse fosforüleerumise languse, mis väljendus P:O tunduvas vähenemises. Seega selgus meie katsetest, et bioflavonoidid stimuleerivad vaba oksüdatsiooni, s. t. et neil on oksüdatsiooni ja fosforüleerumist lahutav toime.

Vaba hingamise (s. o. oksüdatsiooni, millega ei kaasne makroergiliste fosforiühendite, nagu adenosiintrifosfaadi jt. tekkimine) stimuleerimine on sageli seotud adenosiintrifosfataasi (ATF-aasi) aktiivsuse tõusuga kudedes (Скулачев, 1962). Nii näit. 2,4-dinitrofenool põhjustab üheaegselt oksüdatsiooni ja fosforüleerumise lahutamisega ka tunduvat ATF-aasi aktiivsuse tõusu (Cooper, Lehninger, 1957; Hunter, 1956; Potter jt., 1953). ATF-aasi aktiivsus kudedes tõuseb ka mitmesuguste teiste nn. lahutavate ainete (salitsüülhappe, dikumarooli jt.) toimel (Cooper, Lehninger, 1957; Hunter, 1956).

Toetudes eespool öeldule, oli käesoleva töö eesmärgiks välja selgitada, kas bioflavonoidide poolt esilekutsutud oksüdatsiooni ja fosforüleerumise lahutumine on seotud ATF-aasi aktiivsuse tõusuga. Selleks uurisime nii *in vitro* kui ka *in vivo* rutiini ja katehhiinide toimet ATF-aasi aktiivsusesse maksakoe mitokondrites.

Metoodika

Katsed tehti 150—200 g raskuste isaste valgete rottidega. Mitokondrite saamiseks homogeniseeriti klaashomogenisaatoris 1 g maksakude jääkülma 0,25M sahharoosilahusega vahekorras 1:10. Saadud homogenaati tsentrifuugiti detriidi ja rakutuumade eemaldamiseks jahutusseadmega tsentrifuugis 0° C temperatuuris 600 *g* juures 10 minutit. Seejärel eraldati mitokondrid 0° temperatuuris 9000 *g* juures 10 minuti vältel tsentrifuugi-

mise teel. Saadud sadet pesti sahharoosilahusega tsentrifuugides kaks korda ja suspendeeriti siis 6 milliliitris segus, mis koosnes 0,04 M trispuhvrist (pH 7,1), 0,05 M $MgCl_2$- ja 0,1M KCl-lahusest. Igasse katsesse võeti 0,5 ml mitokondrite suspensiooni, mis vastab 3—5 mg valgule. Valgu hulk mitokondrites määrati biureedireaktsiooniga (Cornall jt., 1949).

ATF-aasi aktiivsus mitokondrites määrati M. Blecheri ja A. White'i (1960) poolt kirjeldatud meetodil. Selle alusel hinnatakse ATF-aasi aktiivsust ATF-ist inkubeerimisel vabanenud anorgaanilise fosfori hulga põhjal. Katsesegu (3 ml) koosnes 50 µM trispuhvrist (pH 7,1), 40 µM KCl-ist, 20 µM $MgCl_2$-st ja 3 µM ATF-ist. Katsesegu inkubeeriti 30° temperatuuris 20 minutit. Anorgaanilise fosfori hulk enne ja pärast inkubeerimist määrati kolorimeetriliselt (Фердман, Сопин, 1957). Vabanenud fosfori hulk arvutati mikrogrammides 1 mg mitokondrite valgu kohta.

Bioflavonoidide toime uurimiseks *in vitro* lisati katsesegusse rutiini (firma «Chemapol», Praha, toode) või katehhiine (100%-lise aktiivsusega, Stšelkovo vitamiinitehase toode), nii et nende kontsentratsioon oli 10^{-4}.

Bioflavonoidide toime uurimiseks *in vivo* manustati katseloomadele seitsmel päeval subkutaanselt rutiini või katehhiine annuses 25 mg/kg päevas.

Peale ATF-aasi aktiivsuse jälgiti bioflavonoidide toimet ka mitokondrite optilisele tihedusele, mis määrati spektrofotomeetriga SF-4A lainepikkusel 520 mµ. Katsesegu (2,9 ml) koosnes 0,05 M trispuhvrist (pH 7,1), 0,1 M KCl- ja 0,05 M $MgCl_2$-lahusest. Vahetult enne määramist lisati segule 0,1 ml mitokondrite suspensiooni. Optiline tihedus arvutati 1 mg mitokondrite valgu kohta.

Katsetulemuste tõepärasust hinnati Studenti *t*-testi põhjal.

Katsete tulemused

Tabelist 1 selgub, et nii rutiini kui ka katehhiinide lisamisel katsesegusse ei erinenud ATF-aasi aktiivsus maksakoe mitokondrites oluliselt kontrollrühma andmeist ($P_{dif} > 0{,}5$).

Tabel 1

Rutiini ja katehhiinide toime ATF-aasi aktiivsusesse maksakoe mitokondrites *in vitro*

Katserühm	Katseloomade arv	Vabanenud fosfori hulk µg/mg valgu kohta	P_{dif}
Kontroll	17	$5{,}9 \pm 0{,}55$	—
Rutiin	8	$6{,}1 \pm 0{,}51$	$> 0{,}5$
Katehhiinid	7	$5{,}6 \pm 0{,}89$	$> 0{,}5$

Kui aga mõjustasime mitokondreid eelnevalt samade bioflavonoididega samas kontsentratsioonis (10^{-4}) 60 minuti vältel 2° temperatuuris, võis ATF-aasi aktiivsuses täheldada muutusi (vt. joon.). Kui see kontrolll-loomade mitokondrites 2°-lises temperatuuris seismisel langes $4{,}6 \pm 0{,}67$-le, moodustades ainult 78% vastava katserühma näitajast, siis rutiini ja katehhiinide juuresolekul ta koguni vähesel määral (17—18%) tõusis. Nii oli ATF-aasi aktiivsus rutiiniga mõjustamisel $6{,}9 \pm 0{,}96$ ja katehhiinide puhul $7{,}0 \pm 0{,}88$. Võrreldes kontroll-loomade preinkubeeritud mitokondritega $P_{dif} < 0{,}05$.

Tunduvalt mõjustasid uuritavad bioflavonoidid ATF-aasi aktiivsust maksakoe mitokondrites *in vivo* (vt. tabel 2).

Nii rutiini kui ka katehhiinide manustamisel tõusis ATF-aasi aktiivsus katseloomade mitokondrites märgatavalt, moodustades vastavalt 7,8 ja 7,9 µg fosforit 1 mg valgu kohta. Seega kasvas ATF-aasi aktiivsus seits-

Märkus. Tabelites esitatakse katserühma aritmeetiline keskmine ja selle keskmine viga. P_{dif} tähistab katserühma erinevuse olulisust kontrollist Studenti *t*-testi alusel.

Tabel 2

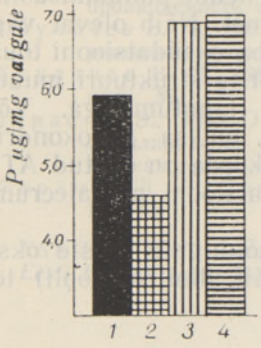
Rutiini ja katehhiinide toime ATF-aasi aktiivsusesse maksakoe mitokondrites *in vivo*

Katserühm	Katseloomade arv	Vabanenud fosfori hulk µg/mg valgu kohta	P_{dif}
Kontroll	17	5,9 ± 0,55	—
Rutiin	10	7,8 ± 0,60	< 0,05
Katehhiinid	8	7,9 ± 0,61	< 0,05

Tabel 3

Rutiiniga ja katehhiinidega preinkubeerimise mõju maksakoe mitokondrite optilisele tihedusele

Katserühm	Katsete arv	Optiline tihedus 1 mg valgu kohta	P_{dif}
Kontroll	9	435 ± 9	—
Rutiin	9	360 ± 11	< 0,01
Katehhiinid	9	374 ± 9	< 0,01



Rutiini ja katehhiinidega preinkubeerimise mõju ATF-aasi aktiivsusele maksakoe mitokondrites:

1 — kontroll
2 — kontroll
3 — rutiin } preinkubeeritud mitokondrid
4 — katehhiinid }

mepäevase bioflavonoidide manustamise tagajärjel rutiini puhul 32% ja katehhiinide puhul 34% ($P_{dif} < 0,05$).

Et välja selgitada, kas ATF-aasi aktiivsuse tõus maksakoe mitokondrites bioflavonoidide mõjul on seotud mitokondrite optilise tiheduse muutumisega, selleks määrasime pärast rutiiniga ja katehhiinidega preinkubeerimist ka mitokondrite optilise tiheduse. Selgus, et mitokondrite mõjustamisel uuritavate bioflavonoididega 2°-lises temperatuuris 60 minuti vältel langeb nende optiline tihedus 14—17%, võrreldes kontrollrühmaga ($P_{dif} < 0,01$).

Arutelu

Katsetulemustest nähtub, et uuritud bioflavonoidid ei mõjustanud ATF-aasi aktiivsust maksakoe mitokondrites *in vitro*. Küll võis aga pärast tunniajalist mitokondrite preinkubeerimist rutiiniga või katehhiinidega tähel dada ATF-aasi aktiivsuse tõusu.

Käesolevate katsete tulemused ühtivad nende andmetega, mida saime bioflavonoidide mõju uurimisel oksüdatiivsele fosforüleerumisele maksakoe mitokondrites (Teras, 1965; Tepac, 1965). Siingi ei avaldanud bioflavonoidid toimet *in vitro*, maksa mitokondrite eelnev mõjustamine nendega aga muutis ka oksüdatiivse fosforüleerumise taset. Nii oli P:O kontrollloomade maksa mitokondrites 1,41 ± 0,19, tunniajalise bioflavonoididega mõjustamise järel aga rutiini puhul 0,85 ± 0,22 ja katehhiinide puhul 0,64 ± 0,09.

Bioflavonoidide toime ATF-aasi aktiivsusesse ilmnes täiesti selgesti *in vivo*. Nii rutiini kui ka katehhiinide parenteraalne manustamine tõstis ATF-aasi aktiivsust maksakoe mitokondrites 32—34%.

Ka L. Kildema ja I. Sibul (Кильдема, Сибуль, 1965) täheldasid *in vivo* ATF-aasi aktiivsuse tõusu katehhiinide toimel.

Kõrvutades käesolevas töös *in vivo* saadud tulemusi bioflavonoidide toimega oksüdatiivsele fosforüleerumisele *in vivo*, näeme tihedat seost P:O näitaja vähenemise ja ATF-aasi aktiivsuse tõusu vahel. Seega võib öelda, et bioflavonoidide toimel tekkinud vaba oksüdatsiooni stimuleerimisega kaasneb ATF-aasi aktiivsuse tõus mitokondrites.

ATF-aasi aktiivsusest suurel määral oleneb ATF hulk mitokondrites, millel omakorda on suur tähtsus mitokondrite struktuuri säilitamisel (Brenner-Holzbach, Raablauf, 1954; Lehninger, 1959a, 1959b). Seetõttu on oksüdatsiooni ja fosforüleerumise lahutumine ning ATF-aasi aktiivsuse tõus sageli seoses mitokondrite struktuuri labiliseerumisega (mitokondrite puudumisega), mis väljendub nende optilise tiheduse vähenemises (Beyer jt., 1955; Harman, Kitiyakara, 1955; Скулачев, 1960, 1962).

Mitokondrite optilise tiheduse vähenemist, seega nende pundumisastme suurenemist, võis täheldada ka bioflavonoidide toimel. Näib olevat väga tõenäoline, et bioflavonoidide poolt esilekutsutud vaba oksüdatsiooni tõusu puhul on tegemist nn. «struktuurse», s. t. mitokondrite struktuuri muutumisest tingitud oksüdatsiooni ja fosforüleerumise lahutumisega. Võib arvata, et bioflavonoidid mõjustavad eeskätt just maksa mitokondrite struktuuri, suurendades nende pundumist, mis omakorda on seotud ATF-aasi aktiivsuse tõusuga ja tõenäoliselt vaba oksüdatsiooni prevaleerumisega maksakoe mitokondrites.

Selle poolest sarnaneb bioflavonoidide toime mõningate teiste oksüdatsiooni ja fosforüleerumist lahutavate ainete (näit. dinitrofenooli) toimega.

Järeldused

1. Rutiin ja teelehtedest saadud katehhiinid ei mõjusta ATF-aasi aktiivsust valgete rottide maksakoe mitokondrites *in vitro*.

2. Maksakoe mitokondrite 60-minutiline preinkubeerimine 2° C temperatuuris rutiini ja katehhiinidega tõstab ATF-aasi aktiivsust neis.

3. Rutiini ja katehhiinide (annuses 25 mg/kg päevas 7 päeva vältel) parenteraalse manustamise toimel suureneb maksakoe mitokondrites ATF-aasi aktiivsus.

KIRJANDUS

Beyer R., Ernster L., Löw H., Beyer T., 1955. Correlation of optical density and oxidative phosphorylation in reconstructed mitochondrial systems. Exptl Cell Res. 8 : 586—588.

Blecher M., White A., 1960. Alternations produced by steroids in adenosine triphosphatase activity and volume of lymphosarcoma and liver mitochondria. J. Biol. Chem. **235** (12) : 3404—3412.

Brenner-Holzbach C., Raablauf J., 1954. Die Korrelation zwischen der Schwellung isolierter Mitochondrien und dem Abbau der intramitochondrialen Adenosinnucleotide (ATP, ADP, AMP, CoA). Helv. physiol. acta **12** : 242—246.

Böhm K., Lamprecht W., 1959. Flavonoide und Herzmuskelstoffwechsel. Ärztl. Forschung **13** (11) : 543—548.

Cooper C., Lehninger A., 1957. Oxidative phosphorylation by an enzyme complex from extracts of mitochondria. IV. Adenosinetriphosphatase activity. J. Biol. Chem. **224** (1) : 547—560.

Cornall A., Bardawill C., David M., 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem. **177** (2) : 757—766.

Harman J. W., Kitiyakara A., 1955. Studies on mitochondria. VI. The relationship between the structure, osmotic activity and ATP-ase activity of mitochondria from pigeon sceletal muscle. Exptl Cell Res. 8 : 411—435.

Hunter F. E., 1956. The relationship of dinitrophenol activated adenosine triphosphatase to uncoupling mechanism and possible phosphorylation of electron transfer catalysis. Proc. III Intern. Congr. Biochem. : 298—300. N. Y.

Lehninger A., 1959a. Reversal of thyroxine-induced swelling of rat liver mitochondria by adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. **234** (8) : 2187—2195
Lehninger A., 1959b. Reversal of various types of mitochondrial swelling by adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem. **234** (9) : 2465—2471.
Potter V. R., Siekevitz P., Simonson H. C., 1953. Latent adenosintriphosphatase activity in resting rat liver mitochondria. J. Biol. Chem. **205** (2) : 893—908.
Teras L., 1962. Rutiini ja teelehtedest valmistatud katehhiinpreparaatide mõjust loomsete kudede hingamisele, II. ENSV TA Toimet., Biol. Seeria **11** (2) 96—106.
Teras L., 1965. Bioflavonoidide toimest oksüdatsioonile ja oksüdeerivale fosforüleerumisele maksakoe mitokondrites. ENSV TA Toimet., Biol. Seeria **14** (2) : 294—302.
Запрометов М. Н., 1955. Витамин Р, его свойства и источник получения. В сб.: Совр. вопр. сов. витаминологии : 48—64. М.
Кильдема Л. А., Сибуль И. К., 1965. О влиянии витамина Р на активность аденозинтрифосфатазы и гексокиназы эритроцитов. Материалы II Биохим. конф. Прибалтийских республик и Белорусской ССР : 39—40. Рига.
Курсанов А. Л., 1957. Предисловие к русскому изданию. В сб.: Биофлавоноиды и проницаемость капилляров : 5—9. М.
Скулачев В. П., 1960. Фосфорилирование в дыхательной цепи. В кн.: Фосфорилирование и функция : 33—43. Л.
Скулачев В. П., 1962. Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи. М.
Терас Л. Э., 1965. О действии биофлавоноидов на окисление и окислительное фосфорилирование в митохондриях печени. Материалы II Биохим. конф. Прибалтийских республик и Белорусской ССР : 48—49. Рига.
Фердман Д. Л., Сопин Е. Ф., 1957. Практикум по биологической химии : 117—118. М.

NSV Liidu Meditsiiniteaduste Akadeemia
Eesti Eksperimentaalse ja Kliinilise Meditsiini Instituut

Saabus toimetusse
15. XII 1965

Л. ТЕРАС

О ВЛИЯНИИ БИОФЛАВОНОИДОВ НА АКТИВНОСТЬ АДЕНОЗИНТРИФОСФАТАЗЫ В МИТОХОНДРИЯХ ТКАНИ ПЕЧЕНИ

Резюме

В ранее проведенных нами исследованиях (Teras, 1962, 1965; Терас, 1965) было показано, что биофлавоноиды (рутин и чайные катехины) действуют разобщающе на окислительное фосфорилирование. Целью настоящей работы было изучить, сопровождается ли разобщающее действие биофлавоноидов изменением активности аденозинтрифосфатазы в митохондриях. Для этого исследовали действие рутина и катехинов на активность аденозинтрифосфатазы (АТФ-азы) митохондрий печени *in vivo* и *in vitro*.

Опыты были поставлены на белых крысах-самцах весом около 200 *г*. Митохондрии печени выделялись в 0,25М растворе сахарозы дробным центрифугированием на холоде при 9000 *g*. В опытах использовали по 0,5 *мл* суспензии митохондрий, что соответствует 3—5 *мг* белка, количество которого определяли биуретовым методом (Cornall и др., 1949).

Для исследования активности АТФ-азы инкубационная смесь содержала 50 *мкмоль* трис, 40 *мкмоль* KCl, 20 *мкмоль* $MgCl_2$ и 3 *мкмоль* АТФ. Смесь инкубировали при 30° С в течение 20 минут. Количество неорганического фосфора определяли колориметрическим методом (Фердман, Сопин, 1957).

При изучении действия биофлавоноидов на активность АТФ-азы *in vitro* добавляли рутин и катехин в концентрации 10^{-4}. В опытах *in vivo* рутин и катехины белым крысам вводили подкожно по 25 *мг* на 1 *кг* веса ежедневно в течение 7 дней.

При математической обработке результатов использовался *t*-тест Стьюдента.

Выяснилось, что *in vitro* рутин и катехины не влияют на активность АТФ-азы в митохондриях печени (табл. 1).

При предварительном воздействии на митохондрии биофлавоноидами в течение 60 минут при 2° можно было обнаружить повышение актизности АТФ-азы на 17—18% (см. рис.). Интересно отметить, что такое же предварительное воздействие биофлавоноидами на митохондрии вызвало и изменения в окислительном фосфорилировании (Терас, 1965).

Действие исследованных биофлавоноидов на активность АТФ-азы, также как и окислительное фосфорилирование (Teras, 1965) митохондрий печени, было ясно выра-

жено *in vivo* (табл. 2). Под влиянием рутина и катехинов активность АТФ-азы повышалась на 32—34%.

На основе полученных в данной работе и ранее результатов можно сделать вывод, что действие биофлавоноидов, разобщающее окислительное фосфорилирование, сопровождается активацией АТФ-азы митохондрий печени. Предположительно это связано с набуханием митохондрий под влиянием биофлавоноидов, что подтверждается соответствующими опытами, из которых выяснилось, что под влиянием биофлавоноидов отмечается падение оптической плотности на 14—17% (табл. 3), свидетельствующее о набухании митохондрий.

На основании полученных результатов кажется вероятным, что введение биофлавоноидов влияет на набухание митохондрий, что в свою очередь связано с увеличением активности АТФ-азы и разобщением окислительного фосфорилирования.

Эстонский институт экспериментальной и клинической медицины
Академии медицинских наук СССР

Поступила в редакцию 15/XII 1965

L. TERAS

THE INFLUENCE OF BIOFLAVONOIDS UPON THE ADENOSINE TRIPHOSPHATASE ACTIVITY IN LIVER MITOCHONDRIA

Summary

The results of our previous works (Teras, 1962, 1965; Tepac, 1965) showed that bioflavonoids (rutin and catechins) have an uncoupling effect upon the oxidative phosphorylation. In order to investigate whether this effect of bioflavonoids is accompanied by the alternation of adenosine triphosphatase activity, the influence of rutin and catechins upon the adenosine triphosphatase (ATP-ase) activity of liver mitochondria *in vitro* and *in vivo* was studied.

The liver mitochondria were isolated in the medium of 0.25M sucrose by centrifugation at 9000 *g*. For each test 0.5 ml of liver mitochondria (3—5 mg protein) were taken. The amount of protein was measured by biuret reaction. The incubation mixture (3 ml) contained: 50 μM tris (pH 7.1), 40 μM KCl, 20 μM $MgCl_2$, and 3 μM ATP. The mixture was incubated at 30° for 20 minutes and the release of inorganic phosphate was determined colorimetrically. Rutin and catechins were added in the concentration of 10^{-4}.

In the experiments *in vivo* rutin and catechins were administered to albino rats subcutaneously in a dosis of 25 mg per 1 kg of weight daily during a period of 7 days.

The results obtained showed that rutin and catechins *in vitro* (in concentration 10^{-4}) did not influence the activity of that enzyme (table 1).

However, by preincubating the mitochondria with bioflavonoids at 2° for 60 minutes the ATP-ase activity was increased by 17—18 per cent (see fig.). It is interesting to mention that this preincubation of liver mitochondria with bioflavonoids also caused a decrease of oxidative phosphorylation (Tepac, 1965).

The action of bioflavonoids studied upon the ATP-ase activity in the liver mitochondria as well as upon the oxidative phosphorylation (Teras, 1965) was clearly shown *in vivo* (table 2).

At the administration of rutin or catechins the ATP-ase activity increased by 32—34 per cent.

Taking into consideration the results obtained in previous and present works, it may be concluded that the uncoupling action of bioflavonoids upon the oxidative phosphorylation is accompanied by the increase of the ATP-ase activity of liver mitochondria.

It may be presumed that this is connected with the swelling of mitochondria caused by the bioflavonoids. Indeed, the experiments revealed that due to the influence of bioflavonoids the optical density of mitochondria decreased by 14—17 per cent (table 3), which showed the increase of swelling.

Thus it is likely that the administration of bioflavonoids influence the swelling of liver mitochondria, which in turn is connected with the increasing of the ATP-ase activity and uncoupling of the oxidative phosphorylation.

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

Received Dec. 15, 1965