

УКРАЇНЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК  
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ТА БІОХІМІЇ ТВАРИН

*На правах рукопису*

ДОЛІБА  
Микола Михайлович

УДК 612.26:612.814:612.015.3

**ХОЛІНЕРГІЧНА РЕГУЛЯЦІЯ  
ЕНЕРГЕТИЧНОГО ОБМІНУ В МІОКАРДІ  
І ТРАВНИХ ЗАЛОЗАХ**

03.00.13 — Фізіологія людини і тварин

Автореферат  
на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Робота виконана на кафедрі фізіології людини і тварин  
Львівського державного університету ім. Івана Франка

Науковий консультант - доктор медичних наук, професор  
І. В. ШОСТАКОВСЬКА.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор  
М. М. СЕРЕДЕНКО,  
доктор медичних наук, професор  
Д. Г. НАЛИВАЙКО,  
доктор біологічних наук, професор  
В. Я. СКОРОХІД.

Провідна установа - Науково-дослідний інститут фізіоло-  
гії при Київському університеті  
ім. Тараса Шевченка.

Захист відбудеться "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 1993р. о "\_\_\_" год на  
засіданні спеціалізованої вченої ради Д. 020.14.01 при Інституті  
фізіології та біохімії Української Академії Аграрних Наук за ад-  
ресом: 290034, м. Львів - 34, вул. В. Стуса, 38.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фі-  
зіології та біохімії тварин УАН.

Автореферат розісланий "\_\_\_" \_\_\_\_\_ 1993р.

КОНТРОЛЬНИЙ ЕКЗЕМПЛЯР

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради  
кандидат біологічних наук

В. Є. РОБАК

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00802762 (P)

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Добре відома роль ацетилхоліну (АХ) як медіатора синаптичної передачі. Однак поряд з медіаторною функцією АХ відіграє важливу роль в регуляції інтенсивності і спрямованості метаболічних процесів. Класичними дослідженнями Дж.Берна (Burn, 1956), М.Г.Удельного (1975), І.А. Аршавського (1960-1982), Г.Н.Кассіля (1983) показано, що АХ, який міститься в тканинах і крові, також має певну фізіологічну дію на тканини, яку можна назвати немет'яторною або дією його як місцевого гормону. Згідно даних і уявлень І.А.Аршавського (1982) концентрація АХ зростає після функціонального навантаження і забезпечує стан спокою зі зниженим поглинанням кисню і перебігом відновних процесів. Такий характер дії АХ передбачає його вплив на внутрішньоклітинні енергетичні процеси. Проте, роль АХ як регулятора енергетичного обміну в клітинах організму, зокрема на мітохондріальному рівні, вивчена недостатньо. В літературі в основному представлені дані про дію АХ на азотистий і білковий обмін в тканині печінки і мозку (Демин, 1967; Нілова, 1973; Елаєв, 1978 та інші). АХ впливає на активність трансаміназ і стимулює білковий синтез. Однак, посилення процесів переамінування може бути істотним фактором підвищення енергетичних процесів (Кондрашова, 1989, 1991). На це вказують дослідження І.В. Шостаковської (1968, 1992), а також наші спільні дослідження (Гордий и др; 1985; Долиба, 1986; Шостаковская и др., 1992), в яких з допомогою радіоактивної мітки чітко показана інтенсифікація обміну АТФ у тканині підшлункової залози, а також значне зростання ефективності окисного фосфорильовання в ізольованих секреторних клітинах і їх мітохондріях (МХ) при введенні тваринам АХ і додаванні його до суспензії клітин. Однак залишаються невідомими механізми такої дії, її притаманність іншим органам і видам тварин.

Відомо також, що стимульовані АХ білоксинтетичні процеси вимагають не тільки енергії АТФ, але і ГТФ. Важливим джерелом ГТФ є

синтез його в процесі субстратного фосфорилування в МХ (Olson, Allguer, 1972). Проте дослідження впливу АХ на субстратне фосфорилування в МХ не проводилися.

У літературі не представлені також комплексні дослідження регуляції енергетичного обміну АХ-ом на різних рівнях організації тваринного організму. Такий підхід важливий для виявлення механізмів, які приймають участь в реалізації впливу введеного АХ на клітинну енергетику. З'ясуванню цих питань і присвячена дана робота.

Мета і завдання дослідження. Метою наших досліджень було вивчення на субклітинному і органному рівнях зміни енергетичного обміну в серці і травних органах при активації холінергічної системи введенням тваринам АХ і прозерину, а також виявлення значення регуляторного впливу холінергічних механізмів на клітинну енергетику в умовах недостатчі кисню та в підвищенні резистентності організму до дії стресорних факторів. Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання:

- вивчити вплив введеного в організм АХ на дихання, окисне та субстратне фосфорилування в МХ міокарду, печінки, підшлункової залози та слизової оболонки тонкої кишки;

- дослідити участь реакцій переамінування в стимуляції дихання і окисного фосфорилування в МХ міокарду і печінки після введення тваринам АХ;

- вияснити роль холінорецепторів у реалізації дії введеного в організм АХ на енергетичний обмін у МХ міокарду і печінки;

- вивчити вплив введеного в організм  $\alpha$ -кетоглутарату Na на енергетичний обмін у МХ міокарду і печінки та порівняти його із впливом АХ;

- дослідити вплив введеного в організм  $\alpha$ -кетоглутарату Na на загальну холінестеразну активність і рівень холіноподібних речовин у крові, а також у тканинах печінки та підшлункової залози;

- з'ясувати особливості впливу на дихання і окисне фосфорилування в МХ одночасного введення в організм АХ та деяких інтер-

медіатів циклу трикарбонних кислот;

- дослідити ефекти АХ на внутрішньоклітинний енергетичний обмін в ізольованому перфузованому серці та печінці;

- вивчити зміни показників енергетичного обміну в серці під впливом холіноміметиків на рівні організму флюориметричним методом і методом ядерно-магнітно-резонансної спектроскопії;

- промодельовати природне підвищення холінергічного статусу організму за умов адаптації до гіпоксичної гіпоксії та вяснити в цих умовах характер змін енергетичного обміну в МХ;

- вяснити роль гпередньої адаптації тварин до гіпоксичної гіпоксії та введення тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату Na у підвищенні резистентності енергетичного обміну міокарду до дії сильних стресорних навантажень на організм.

Наукова новизна. Вперше доведено, що введення в організм АХ стимулює дихання та окисне фосфорилування в МХ міокарду, печінки, підшлункової залози і слизової оболонки тонкої кишки щура і морської свинки шляхом активації окислення в циклі трикарбонних кислот  $\alpha$ -кетоглутарату з одночасним підвищенням спряженості дихання і фосфорилування в МХ досліджуваних органів. Активація окислення  $\alpha$ -кетоглутарату супроводжується зниженням окислення сукцинату. Цей ефект є специфічним для названих субстратів і не виявляється при окисленні інших інтермедіатів циклу Кребса. Така вибіркова регуляція здійснюється за рахунок активації амінотрансферазного шляху утворення  $\alpha$ -кетоглутарату. Стимуляція окислення цього субстрату АХ-ом веде до активації субстратного фосфорилування, яке спряжене з синтезом ГТФ і опосередковує гальмівний вплив АХ на окислення сукцинату в МХ.

На ізольованих гепатоцитах і виділених МХ встановлено, що в механізмі дії екзогенного АХ істотне значення має зростання цитоплазматичної концентрації кальцію, збільшення кальцієвої ємності МХ та підвищення швидкості транспорту катіона в МХ. Показано, що різні концентрації кальцію можуть реципрокно впливати на окислення  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату в МХ.

Виявлено невідоме раніше явище синергізму в дії при сумісному введенні в організм АХ і  $\alpha$ -кетоглутарату Na на енергетичний обмін у МХ. Вперше показано, що введений тваринам  $\alpha$ -кетоглутарат Na знижує холінестеразну активність в крові і збільшує вміст АХ в тканинах серця, печінки і підшлункової залози щура, що свідчить про існування сильного регуляторного зв'язку між дією АХ і  $\alpha$ -кетоглутарату Na на рівні організму.

Показана участь холінорецепторів в реалізації дії введених в організм АХ і  $\alpha$ -кетоглутарату Na на енергетичні процеси в МХ. М-холіноблокатор атропін повністю усуває стимулюючу дію введених в організм АХ і  $\alpha$ -кетоглутарату Na на окисні процеси в МХ печінки, а спільна блокада М- і Н-холінорецепторів атропіном і бензогексонієм знімає ефект АХ у МХ міокарду. Показано, що  $\beta$ -адреноблокатор обзидан, який забезпечує превалювання в організмі парасимпатичного тону, ще більше підсилює ефект введеного АХ на енергетичні процеси в МХ міокарду.

Встановлений стимулюючий вплив введеного в організм АХ на окислення  $\alpha$ -кетоглутарату і підвищення ефективності спряження дихання і фосфорилування відтворюється на ізольованих перфузованих печінці і серці, що свідчить про прямий ацетилхоліновий механізм даного ефекту. На ізольованій перфузованій печінці показаний стимулюючий вплив АХ на глікогонеогенез і синтез глікогену.

Встановлено, що як після введення АХ, так і норадреналіну відбувається окислення піридиннуклеотидів в тканині міокарду собаки, що вказує на активацію окисних процесів у клітинах. Однак, вказані медіатори спричиняють різнонаправлену дію на швидкість поглинання кисню: підвищення у випадку введення норадреналіну і зниження у випадку АХ, що викликано активацією обміну в МХ двох різних енергетичних субстратів -  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату, окислення яких зумовлює різну ефективність окисного фосфорилування. Показано, що зміна адренергічного тону на холінергічний в процесі адаптації тварин до гіпоксичної гіпоксії відображається на мітохондріальному рівні в зміні активації окислення сукцинату.

на  $\alpha$ -кетоглутарат, що призводить до підвищення ефективності спряження дихання і фосфорилування. Встановлено, що попередня адаптація до гіпоксії, а також введення тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату Na підвищують резистентність енергетичного обміну міокарду до дії сильних стресорних навантажень.

На основі проведених досліджень і даних літератури пропонується концепція існування цілісних реципрокних медіаторно (гормонально) - субстратно - нуклеотидних систем адекватного енергетичного забезпечення фізіологічних функцій організму: АХ -  $\alpha$ -кетоглутарат - цГМФ - ГТФ ( $\Delta$ ГФ) і катехоламіни - сукцинат - цАМФ - АТФ. Реципрокність цих систем є необхідною для регуляції потреб клітини в кисні, а також його ефективного використання для синтезу АТФ та інших макроергів в залежності від енергетичних і пластичних потреб клітини.

Науково-практична цінність роботи. Одержані дані розширюють наші уявлення про механізм дії нейротрансмітера АХ на енергетичні процеси в клітинах і МХ. Виявлені особливості впливу АХ і  $\alpha$ -кетоглутарату Na на дихання і окисне фосфорилування в МХ секреторних клітин і міокарду, що полягають в значному підвищенні ефективності спряження дихання і фосфорилування, можуть стати теоретичним обґрунтуванням для медико-клінічних досліджень з метою розробки методів корекції енергетичного обміну і метаболічної терапії при патологічних станах пов'язаних з гіпоксією, дистрофічними змінами нейрогенної природи і тривалими стресорними навантаженнями на організм. Дані про стимулюючий вплив холіноміметиків і  $\alpha$ -кетоглутарату Na на субстратне фосфорилування і синтез ГТФ дозволяють рекомендувати ці речовини як стимулятори відновних анаболічних процесів в клітинах організму. Встановлений факт холіноміметичної дії  $\alpha$ -кетоглутарату Na вказує на можливість його використання як агоніста (синергіста) АХ при корекції клітинної енергетики.

Основні положення, що виносяться на захист:

1. Стимуляція дихання і окисного фосфорилування в МХ міокар-

ду, печінки, підшлункової залози і слизової тонкої кишки введенням тваринам АХ зумовлена активацією окислення  $\alpha$ -кетоглутарату та його утворення в амінотрансферазній реакції.

2. Введення тваринам АХ стимулює субстратне фосфорилування в МХ печінки щура і морської свинки.

3. Гальмівний вплив АХ на окислення сукцинату в МХ опосередковується через гуанілові нуклеотиди, які утворюються в процесі субстратного фосфорилування.

4. Стимулюючий вплив введеного тваринам АХ на енергетичний обмін у МХ опосередковується через М- і Н-холінорецептори.

5. При сумісному введенні в організм  $\alpha$ -кетоглутарату Na і АХ проявляється синергізм їх дії на енергетичний обмін у МХ міокарду і печінки.

6. АХ стимулює дихання і окисне фосфорилування в МХ, виділених з перфузованої ізолюваної печінки, підвищує концентрацію креатинфосфату, фосфатний потенціал і відношення піруват/лактат в перфузованому серці щура.

7. АХ стимулює гліколізогенез в ізолюваній перфузованій печінці щура.

8. Введення АХ викликає окислення піридиннуклеотидів та зниження поглинання кисню тканиною серця собаки.

9. В процесі адаптації тварин до гіпоксичної гіпоксії підвищується холінергічний статус організму, що супроводжується активацією окислення в МХ  $\alpha$ -кетоглутарату і підвищенням спряження дихання і фосфорилування.

10. Попередня адаптація тварин до гіпоксії, а також введення тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату Na підвищують резистентність енергетичного обміну міокарду до дії сильних стресорних впливів.

Агробіологія роботи. Матеріали дисертації доповідалися на Всесоюзних конференціях, з фізіології і біохімії медіаторних процесів (Москва, 1985, 1990), фізіології травлення і всмоктування (Тернопіль, 1986), з питань еволюційної фізіології (Ленінград, 1986), зі здоров'я людини в Сибіру (Красноярськ, 1986), з'їздах Укра-

Інського фізіологічного товариства ім. І.П.Павлова (Львів, 1986; Харків, 1990), Всесоюзному симпозиумі з молекулярних механізмів і регуляції енергетичного обміну (Пушино, 1986), V і VI Українсько-му біохімічному з'їзді (Івано-Франківськ, 1987; Київ, 1992), XV з'їзді Всесоюзного фізіологічного товариства ім. І.П.Павлова (Кишинів, 1987), Всесоюзній конференції по секреції травних залоз у нормі і патології (Андижан, 1988), VII Всесоюзній конференції по біохімії м'язів (Тбілісі, 1989), I Всесоюзному радіобіологічному з'їзді (Москва, 1989), Міжнародному симпозиумі "Signal molecules and mechanisms of anime' behaviour" (Пушино, 1989), Всесоюзній конференції з фізіології і біоенергетики гіпоксії (Пушино, 1990), VI Європейському біоенергетичному конгресі (Нідерланди, 1990), Конференції з актуальних проблем фізіології (Київ, 1992), Міжнародній науковій конференції з питань транспорту кисню і механізмів антиоксидантного захисту організму (Гродно, 1993).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 43 роботи.

Впровадження результатів досліджень. Результати досліджень впроваджені в учбовий процес при читанні лекційних курсів "Фізіологія людини і тварин", "Нормальна фізіологія" і спецкурсів на кафедрі фізіології людини і тварин Львівського держуніверситету ім. Ів.Франка і на кафедрі нормальної фізіології Львівського медичного інституту. Модифікований метод визначення субстратного фосфорилування в мітохондріях, а також розроблений метод виділення функціонально активних мітохондрій з підшлункової залози впроваджені в наукових дослідженнях кафедри фізіології людини і тварин і лабораторії біоенергетики і біологічно активних речовин Львівського університету та лабораторії біофізики клітин Відділення регуляторних систем клітини Інституту біологічної хімії ім. О.В.Палладіна, лабораторії регуляції енергозабезпечення фізіологічних функцій Інституту теоретичної біофізики РАН.

Структура і об'єм роботи. Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, ре-

зультатів досліджень, обговорення та списку використаної літератури. Останній містить 427 бібліографічних найменувань, з яких 89 вітчизняних та 338 зарубіжних. Робота викладена на 257 сторінках машинопису, містить 15 таблиць та ілюстрована 60 рисунками.

### МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для дослідів використовували 3-місячних самців щурів масою 200-220 г і самців морських свинок масою 500-700 г, а також собак. Дослідження ролі холінергічної системи в регуляції енергетичного обміну проводили за такою схемою:

1) підвищення активності холінергічної системи регуляції в організмі моделювалось внутрішньочеревним введенням АХ (в дозах 25, 50 і 100 мкг на 100 г маси за 15, 30 і 60 хв. до декапітації тварин) та інгібітора холінестерази прозерину (5 мкг на 100 г маси за 5 хв. до ін'єкції АХ) з наступним виділенням мітохондріальної фракції міокарду, печінки, підшлункової залози і слизової оболонки тонкої кишки. Вивчалась швидкість дихання, окисного і субстратного фосфорилування в МХ, а також швидкість транспорту кальцію в МХ і кальцієва ємність органел полярографічним (Кондрашова и др., 1973) і рН-метричними методами (Nishimura et al., 1962). Холінергічний статус організму характеризувався вмістом АХ та холінестеразної активності в крові і тканинах організму;

2) для встановлення специфічності дії введеного в організм АХ на показники енергетичного обміну в МХ досліджуваних органів була застосована фармакологічна блокада М-холінорецепторів атропіном (0.5 мг на 100 г маси), Н-холінорецепторів бензогексонієм (1мг на 100 г маси), а також  $\beta$ -адренорецепторів обзиданом (1 мг на 100 г маси);

3) з метою виявлення прямої дії введеного АХ на досліджувані мітохондріальні процеси в міокарді і печінці ацетилхоліновий ефект досліджувався на ізольованих за методом Лангендорфа в модифікації Осбаккен і співавторів (Osbakken et al., 1989) і Міллера

(Miller, 1973) органах, з яких виділялися МХ після додавання холінотропних речовин до перфузату:

4) в умовах організму вплив АХ на показники енергетичного обміну в серці реєструвався на собаках флуоресцентним методом (Mayevsky, Chance, 1982), а також методом ядерно-магнітно-резонансної спектроскопії (Tanaka et al., 1989; Osbakken et al., 1989):

5) виявлення можливого значення регуляторного впливу холінергічних механізмів на клітинну енергетику в умовах недостачі кисню та дії стресорних факторів проводилось при адаптації тварин до гіпоксії та дії іmobilізаційного стресу.

МХ серця і печінки виділяли згідно методу Шнейдера (Shneider, 1950) з урахуванням модифікацій, що забезпечують максимальний нативний стан ізольованих органел (Кондрашова, Григоренко, 1985). МХ із підшлункової залози і слизової оболонки тонкої кишки виділяли по розробленій нами методиці (Konrashova, Doliba, 1989; Шостаковская, Долиба, 1989) з врахуванням методичних підходів до виділення МХ з цих органів (Алматов и др., 1977; Wilson et al., 1984).

Виділення ізольованих гепатоцитів проводили за методом Вільямсона (Williamson et al., 1981). Реєстрацію цитоплазматичної концентрації кальцію проводили спектрофотометричним методом (Staddon, McGivan, 1985), використовуючи флуоресцентні речовини Квін 2 (50 мкМ) або Індо-1 (10 мкМ). Відносні концентрації оксигенованої і дезоксигенованої форми міоглобіну вимірювали спектрофотометричним методом, використовуючи гнучкі світлові оптичні проводи, що накладалися на апікальну поверхню міокарду (Chance et al., 1988). Для вимірювання швидкості поглинання кисню у вхідний і вихідний потоки ізольованого органу поміщали Кларківські електроди і в перфузаті полярографічним методом реєстрували напруженість кисню ( $PO_2$ ).

Активність аспартат- і аланінамінотрансфераз визначали за методом Осадчої (1982), активність сукцинатдегідрогенази - за ме-

Н. Д. Єщенко (1982). Ферментними аналізами визначали концентрації глюкози (Bergmeyer, Bernt, 1974), пірувату (Bucher et al., 1974), лактату (Hohorst, 1974), глікогену (Keppler, Decker, 1984), аденілових нуклеотидів (АТФ, АДФ, АМФ) (Lamhrecht, Tracetshold, 1974). Вміст ацетилхоліну і холінергезну активність визначали за методом Хестріна (1949), а також біологічним методом (Експериментальна фізіологія /Под ред. Б. Л. Андреева. - М.: Мир, 1974. - С. 65-68). Катехоламіни - за методом Осінської (1957). Концентрацію білка вимірювали за методом Лоурі (Lowry et al., 1951).

При адаптації тварин до гіпобаричної гіпоксії їх поміщали в барокамеру і створювали в ній парціальний тиск кисню 32 мм рт. ст., що відповідає висоті 7000м. Тривалість перебування тварин в барокамері в перший день становила 3 год., наступні дні - 4 год. Тварин піддавали впливу гіпобаричної гіпоксії протягом 16 днів. Декапітацію тварин і виділення МХ проводили через 24 год. після останнього сеансу гіпобаричної гіпоксії. Імобілізаційний стрес викликали знерухоменням тварин в спеціальній клітці (Бабський, Шостаковська, 1992).

Всі отримані результати опрацьовувались статистично за Стьюдентом і Вілкоксоном (Гублер, Генкин, 1973).

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

1. Зміни дихання і окисного фосфорилування в мітохондріях міокарду при введенні тваринам ацетилхоліну. При вивченні змін показників енергетичного обміну в МХ після введення тваринам АХ, ми дотримувалися вироблених раніше М. М. Кондрашовою і О. В. Григоренко (1981, 1985) підходів, спрямованих на виявлення вкладу окислення окремих субстратів у загальне споживання кисню. При цьому використовувались низькі, близькі до фізіологічних, концентрації субстратів (0,35-1мМ), на яких фізіологічні ефекти нейротрансмітерів більш виражені (А. М. Бабський и др., 1985). Швидкість дихання МХ реєстрували в різних метаболічних станах по Чансу

(Chance, 1961) і представляли в діаграмному зображенні.

Основні зміни, що наступають у диханні і окисному фосфорильованні в МХ після введення тваринам АХ, полягали у реципрокній зміні окислення двох енергетичних субстратів - активації окислення  $\alpha$ -кетоглутарату і гальмуванні окислення сукцинату. Це виявлялось у реципрокній зміні швидкості АДФ-стимульованого дихання при окисленні цих субстратів. На рис.1 представлені діаграми дихання МХ міокарду щура в різних метаболічних станах по Чансу

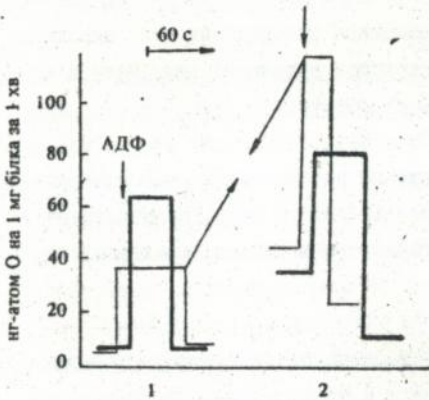


Рис.1. Реципрокна зміна швидкості АДФ-стимульованого дихання при окисленні  $\alpha$ -кетоглутарату (1) і сукцинату (2) в МХ серця щура після введення тваринам АХ (50мкг/100г; час дії - 15хв.). Тут і далі: тонка лінія - контроль, товста - введення АХ (50мкг/100г) і прозерину (5мкг/100г). Представлений типовий дослід.

(Chance, 1961). Початкова частина діаграми відображає швидкість дихання при окисленні субстрату - стан 2 ( $V_2$ ). Підйом швидкості дихання відповідає його стимуляції АДФ - стан 3 ( $V_3$ ), наступне зниження - дихання в умовах вичерпання АДФ і окислення субстрату - стан 4 ( $V_4$ ). Субстрати окислення: А-1мМ  $\alpha$ -кетоглутарат; Б-0.35 мМ сукцинат. Привертає увагу, що швидкості АДФ-стимульованого дихання при окисленні обидвох субстратів, які сильно відрізняються без введення тваринам АХ (тонка лінія), суттєво зближуються після його ін'єкції тваринам (товста лінія). Стимуляція швидкості дихання МХ у стані  $V_3$  при окисленні 1 мМ  $\alpha$ -кетоглутарату складає

58%, а при окисленні 0.35 мМ сукцинату спостерігається 23%-не її гальмування. Зміна торкається саме швидкості дихання в стані  $V_3$ , оскільки дихання в стані  $V_4$  не змінюється для  $\alpha$ -кетоглутарату і змінюється менше, ніж у стані  $V_3$  для сукцинату.

Слід звернути увагу на загальну закономірність, яка, як буде показано далі, виявляється на МХ різних органів - хоча дихання при окисленні  $\alpha$ -кетоглутарату зростає, а дихання при окисленні сукцинату знижується, в обох випадках спостерігається підвищення ефективності окисного фосфорилування. Коефіцієнт АДФ/О при окисленні 1 мМ  $\alpha$ -кетоглутарату зростає на 48%, а при окисленні сукцинату - на 15%. Цей ефект виявився специфічним для вказаних субстратів, оскільки не проявлявся при окисленні глутамату з малонатом, пірувату, малату, а також ізоцитрату.

Виявлена специфічна реципрокна зміна окислення двох субстратів під впливом АХ у МХ міокарду не вкладається в класичні уявлення про цикл Кребса як чітку послідовність перетворення трикарбонових кислот. Тому виникло питання про механізми реалізації такого впливу.

2. Органна і видова залежність величини стимулюючого ефекту ацетилхоліну на енергетичні процеси в мітохондріях. Величина стимуляції окислення  $\alpha$ -кетоглутарату в МХ після введення тваринам АХ сильно залежала від досліджуваного органу, а також виду тварини. Найбільш чіткі зміни спостерігаються в МХ тканин, які знаходяться під більш сильним впливом парасимпатичної нервової системи: слизова тонкої кишки (238% від контролю), підшлункова залоза (186%), міокард (158%) і печінка (136%). Ефект АХ яскравіше виражений при стимуляції дихання кальцієм, замість АДФ.

Величина стимулюючої дії введеного АХ залежить і від нейрогуморального статусу тварини. Це чітко виявляється при порівнянні величини стимуляції окислення  $\alpha$ -кетоглутарату АХ-ом в МХ міокарду і печінки щура і морської свинки. Стимулююча дія АХ на АДФ-стимульоване дихання в МХ серця морської свинки на 30% вища у порів-

нянні з міокардом щура. Більша вираженість ефекту АХ у тканині морської свинки може бути пояснена холінергічним зсувом метаболізму цієї тварини (Сорохтин, 1968). Завдяки цьому ефект введеного АХ більш виражений на фоні вищого рівня ендogenous. На останнє вказує збільшення прозерином ефекту введеного АХ на окислення  $\alpha$ -кетоглутарату в МХ міокарду щура. Прозерин, введений за 5-10 хв. до ін'єкції АХ, не тільки збільшує приріст швидкості дихання під впливом АХ, але і скорочує час фосфорилування доданої АДФ і значно підвищує ефективність окисного фосфорилування як у контрольній так і у дослідній тварини. Таким чином, введення прозерину створює холінергічний ефект у тварин, який ще підсилюється АХ.

3. Дозова і часова залежність дії введеного в організм ацетилхоліну на дихання і окисне фосфорилування в мітохондріях. Дозова і часова залежність ефекту дії АХ на енергетичні процеси мала органу специфічність. Підвищення дози АХ від 25 до 50 мкг на 100 г маси тварини викликало збільшення ефекту АХ на швидкість АДФ-стимульованого дихання як у МХ печінки, так і у МХ міокарду. Однак, коли підвищення дози АХ до 100 мкг на 100 г маси на МХ печінки призводило до незначного збільшення стимулюючого ефекту, то в МХ серця ця дія значно зменшувалась. Дзеркальним відображенням цього ефекту була дія АХ на окислення сукцинату. При цьому чим більше проявлялася активація окислення  $\alpha$ -кетоглутарату, тим сильніше було виражено гальмування на сукцинаті.

Для в'яснення часової динаміки ефекту АХ дослідили його вплив у дозі, що викликає найбільш чіткий ефект - 50 мкг на 100 г маси, через 5, 15, 30 і 60 хв. після його внутрішньочеревного введення. Виявилось, що найчіткіша дія АХ на енергетичні процеси в МХ печінки спостерігалася на 30 хв., тоді як в МХ серця максимум ефекту відмічався на 15 хв. після введення АХ. Через 60 хв. істотних відмінностей у порівнянні з контролем не відмічалось як у МХ печінки, так і в МХ міокарду. Таким чином, у МХ міокарду стимуляція окисних процесів настає раніше і при меншій дозі, а

також згасає швидше в часі у порівнянні з МХ печінки. Очевидно, що МХ міокарду є більш чутливими до дії АХ.

4. Вплив введеного тваринам ацетилхоліну на спряжене з окисленням  $\alpha$ -кетоглутарату субстратне фосфорилування в мітохондріях печінки. Відомо, що окислення  $\alpha$ -кетоглутарату є джерелом не тільки для синтезу АТФ у дихальному ланцюгу, але і синтезу ГТФ при фосфорилуванні на рівні субстрату або субстратному фосфорилуванні. В даній роботі ми використали і модифікували з метою кращого відтворення запропонований Олсоном (Olson, Allguer, 1972) метод полярографічної реєстрації субстратного фосфорилування за автоінгібуванням неспряженого з фосфорилуванням дихання МХ при окисленні  $\alpha$ -кетоглутарату. Олсоном показано, що гальмування дихання в цих умовах зумовлене продуктом субстратного фосфорилування - ГТФ, завдяки чому по зниженню споживання кисню можна слідкувати за процесом утворення цього нуклеотиду. Результати наших дослідів представлені на рис.2. У випадку окислення будь-якого субстрату, крім  $\alpha$ -кетоглутарату, швидкість поглинання кисню лінійно зростає після додавання роз'єднувача СІССР до тих пір, поки весь кисень не вичерпається. Зокрема, це видно із рисунка (крива а) при окисленні пірувату і малату. Однак, при додаванні до МХ крім пірувату і малату  $\alpha$ -кетоглутарату (крива б) швидкість роз'єданого дихання залишається лінійною  $\sim 30$  секунд, після чого проявляється гальмування швидкості дихання. Олсоном і Елджером (Olson, Allguer, 1972) показано, що це інгібування зв'язане з синтезом ГТФ. Ефект гальмування дихання ще більш чітко виявляється при додаванні до середовища інкубації тільки  $\alpha$ -кетоглутарату (крива в). Із рисунка також видно, що при введенні тваринам АХ (2) гальмування неспряженого з фосфорилуванням дихання при окисленні  $\alpha$ -кетоглутарату настає раніше і більш виражене (добавки АДФ і сукцинату усувають його). Останнє вказує на активацію АХ субстратного фосфорилування і синтезу ГТФ. Стимуляція цього процесу в МХ печінки морської свинки (А) на 60% вища, ніж у печінці щура (Б).

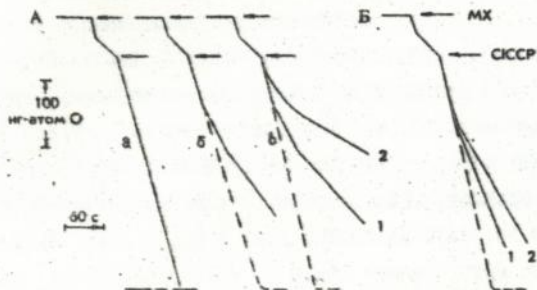


Рис. 2. Вплив введеного тваринам АХ на субстратне фосфорилування в МХ печінки щура (А) і морської свинки (Б). Пояснення в тексті.

Підсилення субстратного фосфорилування при збільшенні в організмі холінергічних впливів, на нашу думку, пояснюється необхідністю забезпечення ГТФ анаболічних процесів, індукованих АХ: гліконеогенез, синтез нуклеїнових кислот, білка. Незважаючи на існування інших шляхів утворення ГТФ, його синтез у субстратному фосфорилуванні уявляється найоперативнішим.

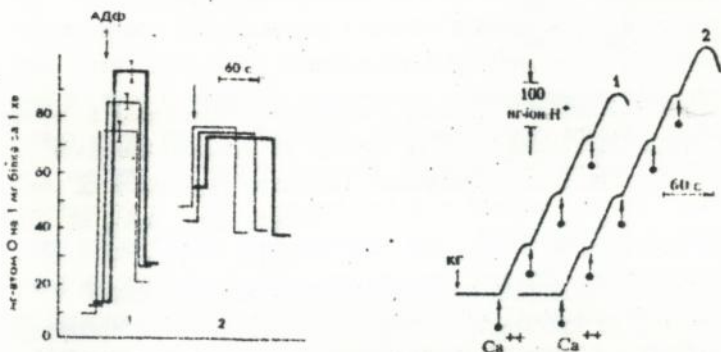
5. Значення холінорецепторів в реалізації дії введеного в організм ацетилхоліну на енергетичний обмін в мітохондріях. Про специфічність дії АХ на метаболічні процеси в клітинах судять по усуненню його ефекту холіноблокаторами. Результати дослідів показали, що введений в організм за 30 хв до ін'єкції АХ М-холіноблокатор атропін повністю знімає стимулюючий вплив АХ на дихання МХ печінки. Проте, в МХ міокарду щура атропін лише частково усуває ефект дії медіатора на окислення  $\alpha$ -кетоглутарату. Тому ми провели дослідження впливу АХ в умовах одночасної блокади М- і Н-холінорецепторів атропіном і бензогексонієм. Сумісне введення атропіну і бензогексонію за 30 хв. до введення щурам АХ призводить до зниження швидкості АДФ-стимульованого дихання і значного збільшення часу фосфорилування доданої АДФ у порівнянні з МХ інтактних тварин. Введення на цьому фоні АХ не викликає достовірного збільшення швидкості АДФ-стимульованого дихання.

6. Підсилення ефекту екзогенного ацетилхоліну на енергетичний обмін у мітохондріях міокарду при блокаді  $\beta$ -адренорецепторів. Відомо, що АХ викликає звільнення катехоламінів із мозкового шару наднирників (Mizobe et al., 1982; Greenberg, Linder, 1982). Є також дані про стимулюючий вплив АХ на звільнення депонованих серцем катехоламінів (Cabrea et al., 1966; Hoffman et al., 1945), а також про активуючий вплив на синтез норадреналіну (Angelacos, Bloomquist, 1965). Враховуючи це, ми припустили, що введення *in vivo* АХ може вплинути на обмін катехоламінів, а це, в свою чергу, модифікувати дію АХ на енергетичний обмін у МХ серця. Тому ми провели дослідження впливу введеного в організм АХ на окисні процеси в МХ в умовах блокади  $\beta$ -адренорецепторів обзиданом. Введення тваринам обзидану за 30 хв до ін'єкції АХ призводить до активації окислення  $\alpha$ -кетоглутарату (рис.3), як наслідок превалювання парасимпатичного тонуусу в організмі. Ця активація окислення  $\alpha$ -кетоглутарату ще більше підсилюється при введенні тваринам АХ.

7. Значення іонів кальцію в механізмах реалізації впливу ацетилхоліну на дихання і окисне фосфорилування в мітохондріях. Відомо, що стимуляція кальцієм дихання пропорційна швидкості транспорту катіона в МХ (Kondrashova et al., 1982). Результати досліджень вказують на те, що АХ викликає чітку активацію у порівнянні з контролем (на 65%) швидкості дихання МХ печінки в метаболічному стані  $V_3$  при його стимуляції  $Ca^{2+}$ . При цьому швидкість транспорту  $Ca^{2+}$  в МХ зростає при введенні АХ (50мкг/100г) на 87%. Вказані зміни відбуваються без ознак роз'єднання дихання і фосфорилування, оскільки при цьому дихальний контроль і відношення  $Ca^{2+}/O$  зростають на 48 і 10%, відповідно.

Апликація в середовище до ізольованих гепатоцитів АХ ( $10^{-6}$ М) викликає зростання цитоплазматичної концентрації кальцію, вимірної спектрофотометрично за допомогою Індо-1. Однак, сподіване підвищення  $Ca^{2+}$  не є таким значним як у випадку дії глюкагону і іонізаційного (Williamson et al., 1981).

Поряд із підвищенням цитоплазматичної концентрації кальцію має місце зростання кальцієвої ємності МХ - максимальної кількості кальцію, яку здатні поглинути МХ без зворотніх функціональних порушень. З метою її оцінки МХ титрували невеликими кількостями  $\text{CaCl}_2$  (по 11 нмоль на мг білка) до початку спонтанного викиду  $\text{Ca}^{2+}$ . Як видно із рис. 4, МХ тварин, яким вводився АХ, вибирають на одну добавку  $\text{CaCl}_2$  більше, ніж МХ контрольних тварин.



1 -  $\alpha$ -кетоглутарат, 2 - сукцинат.

Рис. 3. Модифікація ефекту введеного АХ на дихання МХ серця щура в умовах блокади  $\beta$ -адренорецепторів обзиданом. Тонка лінія - контроль, середня - введення обзидану (1мг/100г), товста - АХ.

Рис. 4. Типовий приклад рН-метричної реєстрації кальцієвої ємності МХ печінки щура. 1 - контроль, 2 - введення АХ.

Вивчення залежності ефекту АХ від концентрації кальцію в середовищі інкубації показало, що додаткове внесення іонів  $\text{Ca}^{2+}$  в середовище інкубації викликає збільшення швидкості дихання МХ контрольних тварин при відсутності приросту швидкості дихання МХ дослідних тварин. Це вказує на вищий вихідний рівень внутрішньомітохондріальної концентрації кальцію МХ дослідних тварин.

8. Участь реакцій переамінування в стимуляції дихання і окисного фосфорилування в мітохондріях печінки і міокарду після введення тваринам ацетилхоліну. Вибіркова активація  $\alpha$ -кетоглутарату в МХ при введенні тваринам АХ ставить питання про шляхи додаткового утворення  $\alpha$ -кетоглутарату, окрім циклу Кребса. Уявлялось ймовірним, що таким додатковим джерелом може бути утворення  $\alpha$ -кетоглутарату шляхом переамінування з участю амінотрансфераз. На користь такого припущення свідчать літературні дані (Нилова, 1973) про активуючу дію АХ на активність аспартатамінотрансферази, що може призводити до збільшення вмісту і інтенсивності обміну  $\alpha$ -кетоглутарату, а також дані М.Н.Кондрашової (1988, 1989, 1991) про участь процесів переамінування в окисленні субстратів у МХ. З метою перевірки даного припущення було досліджено вплив АХ на окислення суміші глутамату і малату, а також пірувату і глутамату - субстратів, які включаються в процес переамінування з утворенням ендogenousного  $\alpha$ -кетоглутарату. Для ідентифікації участі цього процесу застосовували інгібітор трансаміназ амінооксиацетат. Як видно із рис.5 при окисленні добавленої суміші глутамату і малату, а також пірувату і глутамату спостерігається характерна стимуляція АДФ-стимульованого дихання МХ печінки щурів, яким попередньо вводився АХ (50 мкг на 100 г маси). Додавання інгібітора переамінування амінооксиацетату сильно знижує дихання МХ як контрольних, так і дослідних тварин при окисленні суміші глутамату і малату, повністю усуваючи його приріст під дією АХ: При окисленні суміші глутамату і пірувату амінооксиацетат істотно не впливає на швидкість АДФ-стимульованого дихання, однак повністю усуває активуючий ефект АХ. Очевидно, що в даному випадку, амінооксиацетат перериває трансаміназний шлях утворення  $\alpha$ -кетоглутарату, активацію окислення якого ми спостерігали при дії АХ. На користь такого припущення вказують дані про відсутність стимулюючої дії АХ на окислення окремо взятих глутамату, малату і пірувату.

На роль амінотрансфераз в механізмах впливу АХ на енергетичні процеси в МХ вказують також дані по вимірюванню активності ас-

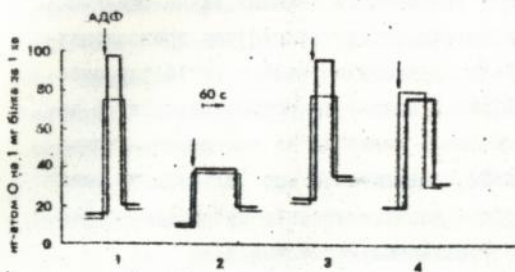


Рис. 5. Вклад реакцій переамінування в сти- мулюючий ефект введення АХ на дихання МХ печінки щура. 1- глутамат+малат; 2- глутамат+ малат+ аміноокси- ацетат; 3-піруват+глу- тамат; 4-піруват+ глу- тамат+ амінооксиацетат

партат- і аланінамінотрансфераз в тканині підшлункової залози щура. Введення тваринам АХ (50 мкг на 100 г маси) призводить через 15 хв. до збільшення активності аспартат- і аланінамінотрансферази на 38 і 32%, відповідно.

9. Механізм гальмівного впливу ацетилхоліну на окислення сукцинату в мітохондріях. У літературі вказується на роль оксалоацетату в обмеженні окислення сукцинату за умов дії великих доз катехоламінів (Кондрашова, Бабский, 1986) і стресорних навантаженнях на організм (Кондрашова, Григоренко, 1981, 1985). Цей феномен носить назву оксалоацетатного гальмування і усувається активаторами сукцинатдегідрогенази - ізоцитратом, глутаматом,  $\beta$ -оксибутиратом,  $\alpha$ -гліцерофосфатом. Однак, в нашому випадку, гальмування окислення сукцинату не пов'язане з нагромадженням оксалоацетату, оскільки активатор сукцинатдегідрогенази ізоцитрат не знімає його, а навіть посилює.

В літературі вказується на гальмівну роль  $\alpha$ -кетоглутарату і ГДФ на окислення сукцинату в МХ (Саакян, 1976; Ахмедов, 1986). Враховуючи ці дані, ми припустили, що гальмівна дія АХ на окислення сукцинату може бути опосередкована через ГДФ, синтез якого активується АХ-ом в процесі субстратного фосфорильвання. З метою

ідентифікації участі окислення  $\alpha$ -кетоглутарату і субстратного фосфорилування в механізмі гальмуючого впливу АХ на окислення сукцинату ми застосували амінооксиацетат - інгібітор трансаміназного утворення  $\alpha$ -кетоглутарату, а також арсеніт - інгібітор субстратного фосфорилування. Із рис. 6 видно, що амінооксиацетат і арсеніт повністю усувають гальмівний вплив АХ на окислення сукцинату. Враховуючи ці дані, можна стверджувати, що гальмування окислення сукцинату опосередковано через активацію субстратного фосфорилування і нагромадження гуанілових нуклеотидів.

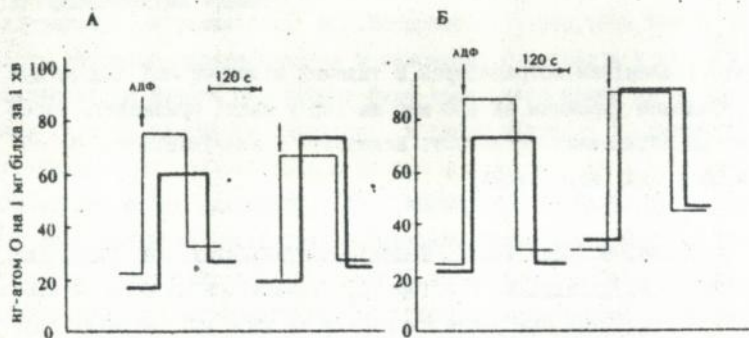


Рис. 6. Усунення амінооксиацетатом (А) і арсенітом (Б) гальмівної дії АХ на окислення сукцинату в МХ печінки щура. 1 і 3 - сукцинат, 2 - сукцинат + амінооксиацетат, 4 - сукцинат + арсеніт.

10. Синергізм дії введених в організм  $\alpha$ -кетоглутарату Na і ацетилхоліну на дихання мітохондрій і нейрогуморальний статус організму. Одержані результати вказали на існування сильного регуляторного зв'язку між дією АХ і обміном  $\alpha$ -кетоглутарату в МХ. З іншого боку, відомо, що дія катехоламінів тісно пов'язана з активацією окислення в МХ сукцинату (Бабський и др., 1985). Ми припустили, що субстрати в кожній парі є не тільки джерелом енергії, але і виконують специфічну сигнальну функцію впливу на активуючий їх окислення нейротрансмітер. Це припущення підтверджувалося да-

ними про стимуляцію сукцинатом секреції катехоламінів і інгібування  $\alpha$ -кетоглутаратом холінестерази (Каранова, 1976; Maevsky et al., 1982). Враховуючи ці дані, ми дослідили вплив  $\alpha$ -кетоглутарату Na введеного в організм на окислення субстратів у МХ міокарду і печінки, а також активність холінестерази і рівень АХ у крові та тканині печінки.

Виявилось, що при дослідженні дії введеного  $\alpha$ -кетоглутарату Na на окислення субстратів були одержані такі ж результати, як і при дії АХ. Введення тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату Na стимулює на 88% окислення внутрішнь-мітохондріального  $\alpha$ -кетоглутарату в МХ печінки щура. Активація окислення  $\alpha$ -кетоглутарату його введенням зв'язана з істотним збільшенням ефективності спряження дихання і фосфорилування. Це узгоджується з дією АХ на коефіцієнт АДФ/О, причому ефект  $\alpha$ -кетоглутарату Na навіть перевищує ефект АХ. Інший аспект дії АХ на окислення субстратів в МХ - гальмування окислення фізіологічної концентрації сукцинату (0.25-0.35мМ), також відтворюється при введенні тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату Na. Як і у випадку введеного АХ, дія введеного  $\alpha$ -кетоглутарату Na сильніше виражена в МХ міокарду, які містять менше ендогенних субстратів.

Останній аспект співставлення дії  $\alpha$ -кетоглутарату Na і АХ на дихання МХ полягав у порівнянні їх дії на окислення  $\alpha$ -кетоглутарату, утвореного шляхом переамінування глутамату і малату. У випадку дії введеного  $\alpha$ -кетоглутарату Na ми також виявили активуючий вплив на окислення суміші глутамату з малатом, а також пірувату з глутаматом, що призводить до утворення ендогенного  $\alpha$ -кетоглутарату шляхом переамінування. Виявилось, що об'єм чутливого до, амінооксиацетату дихання значно вищий у МХ дослідних тварин і стимулюючий ефект інтермедіата повністю усувається інгібітором переамінування.

Таким чином, по впливу на дихання і окисне фосфорилування в МХ дія введеного  $\alpha$ -кетоглутарату і АХ виявилась практично ідентичною. Виникло питання - чи не опосередкований ефект  $\alpha$ -кетоглутарату Na через АХ, можливо, через інгібування холінестерази (Ка-

ранова, 1976). Результати досліджень показали, що через 30 хв. після введення тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату Na холінергічна активність знижується в цільній крові на 49%, а в тканині підшлункової залози щура в 4. 2.7 і 1.7 рази, відповідно через 30, 60 і 180 хв. після введення інтермедіату (рис. 7, А). Поряд із зниженням холінергічної активності спостерігається істотне збільшення рівня АХ у тканинах печінки на 60% і в підшлунковій залозі (рис. 7, Б). Одночасно спостерігається зниження на 45% вмісту адреноподібних речовин у тканині печінки. 5-ти денне хронічне поїння тварин  $\alpha$ -кетоглутаратом Na призводить до зниження вмісту адреналіну і норадреналіну в тканині печінки на 22 і 17%, відповідно. Таким чином, виявлений нами ефект дії  $\alpha$ -кетоглутарату Na, очевидно, опосередкований через підвищення активності холінергічної системи організму. На це вказують результати дослідів із блокадою холінорецепторів, а також спільне введення АХ і  $\alpha$ -кетоглутарату Na. Блокада М-холінорецепторів атропіном майже повністю усувала ефект введеного  $\alpha$ -кетоглутарату Na (рис. 8, А і Б). Спільне введення АХ і субстрату значно посилювало активуючий вплив на АДФ-стимульоване дихання (рис. 8, В).

11. Регуляція енергетичного обміну ацетилхоліном в ізольованому перфузованому серці щура. Відомо, що ефект введеного в організм АХ на енергетичний обмін може бути опосередкований через багато нейрогуморальних ланок організму. Зокрема, відомо, що АХ стимулює звільнення катехоламінів із мозкового шару наднирників (Greenberg, Zinder, 1982), звільнення інсуліну із  $\beta$ -клітин підшлункової залози (Lundquist, 1982) і т.д. З метою виключення висказаних впливів ми дослідили ефект АХ на енергетичний обмін в ізольованих перфузованих органах - серці і печінці щура.

Результати досліджень вказали на те, що АХ викликає дозозалежне зниження швидкості коронарного кровотоку, а також добутку частоти скорочення серця на систолічний тиск крові: Однак, достовірні зміни відзначаються при високих дозах АХ ( $1 \times 10^{-7}$  і  $1 \times 10^{-6}$  М). Низька доза АХ ( $1 \times 10^{-8}$  М) не викликає достовірних змін. Тому ця

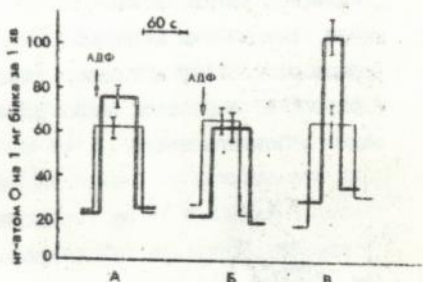
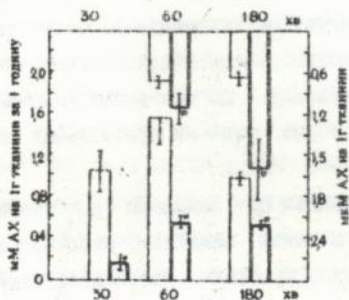


Рис. 7. Вплив введеного в організм  $\alpha$ -кетоглутарату Na (20 мг/100г) на вміст АХ (А) і холінестеразну активність (Б) у тканині підшлункової залози.

Рис. 8. Усунення атропіном (Б) і підсилення АХ (В) стимулюючого ефекту  $\alpha$ -кетоглутарату Na (А) на дихання МХ печінки щура.

Субстрат окислення -  $\alpha$ -кетоглутарат.

доза АХ стала основною при оцінці впливу медатора на енергетичний обмін.

На рис. 9 представлений  $^{31}\text{P}$ -ЯМР спектр концентрацій фосфорвмісних сполук у тканині міокарду у контролі і за дії різних доз АХ. Перші три піки відображають (зліва направо) концентрації фосфомоноестерази, неорганічного фосфату і фосфодiestерази; два наступні - креатинфосфату (КФ) і АТФ. Комп'ютерний перерахунок концентрацій даних сполук показав, що АХ у дозі, в якій не викликає змін показників механічної діяльності серця, призводить до достовірного зростання концентрації креатинфосфату на 20% і зменшення вмісту АДФ на 42% і АМФ на 69% і зростанню на 48% фосфатного потенціалу (АТФ/АДФ · АМФ). Такі зміни у відношенні фосфокреатину і аденілових нуклеотидів, а також зростання фосфатного потенціалу можуть вказувати на стимулюючий вплив АХ та енергетичний обмін.

Одночасне вимірювання швидкості поглинання кисню показало, що виявлена стимуляція енергетичного обміну відбувається без активації споживання кисню. Більше того, виявляється тенденція до його зниження. Визначення відношення між оксигенованою і дезоксигенованою формою міоглобіну в тканині серця вказало, що при дозах, менших  $2.5 \times 10^{-8}$  М, переважає оксигенована форма, тоді як при більших дозах - дезоксигенована.

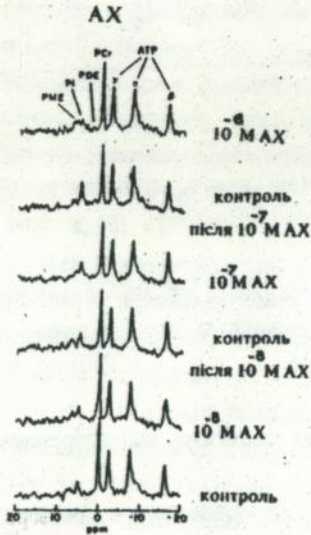


Рис. 9.  $^{31}\text{P}$ -ЯМР спектр ізольованого перфузованого серця щура.

Тенденція до зниження поглинання кисню, а також зниження коронарного кровотоку і зростання дезоксигенованої форми міоглобіну при зростанні дози AX - всі ці фактори могли стати причиною активації гліколізу і нагромадження в тканині вмісту лактату. Однак, вміст лактату не тільки не збільшується, але істотно зменшується як під впливом  $1 \times 10^{-9}$  М AX (на 39%), так і  $2 \times 10^{-7}$  М AX (на 40%). Вміст пірувату при цьому достовірно не змінюється. Відношення піруват/лактат, яке вказує на цитоплазматичне відношення НАД /НАДН (Williamson et al., 1966) істотно зростає в клітинах серця (на 35% при дозі  $1 \times 10^{-9}$  М AX). Визначення вмісту глікогену в замороженій тканині вказало на те, що він зростає під впливом AX з  $0,012 \pm 0,003$  мг/мг білка до  $0,02 \pm 0,0008$  мг/мг білка.

Одержані дані можуть вказувати на те, що виявлена стимуляція енергетичного обміну не пов'язана з активацією гліколізу. Причиною таких змін, очевидно, може бути виявлене на МХ значне зростання ефективності окисного фосфорилування.

## 12. Вплив ацетилхоліну на вміст аденілових нуклеотидів в

ізолюваній перфузованій печінці. На ізолюваній перфузованій печінці щура встановлено, що низька доза АХ ( $1 \times 10^{-7}$  М) призводить до зростання концентрації АТФ. Одночасно, на відміну від серця, достовірно зростає концентрація АДФ і АМФ. Очевидно, це вказує на те, що поряд з активацією синтезу АТФ має місце і активація його гідролізу. Додавання в перфузат високої дози АХ ( $1 \times 10^{-6}$  М) викликає достовірне зниження концентрації АТФ і зростання рівня АДФ, АМФ і Фн. Такі зміни рівня аденілових нуклеотидів, очевидно, зв'язані із зниженням оксигенації тканин внаслідок викликаного АХ звуження судин печінки. Так нами показано, що АХ викликає дозозалежне зниження швидкості циркуляції в системі ворітня, черевна і печінкова вени. На це також вказує зниження АХ-ном ( $1 \times 10^{-6}$  М) поглинання кисню, яке слабо виражене в безкальцієвому розчині і різко зростає при додаванні 2 мМ  $\text{CaCl}_2$ .

Визначення вмісту пірувату і лактату в замороженій тканині печінки показало, що концентрація останнього достовірно не змінюється під впливом малих доз АХ ( $1-5 \times 10^{-7}$  М) і дещо підвищується при великій дозі. Концентрація пірувату істотно зменшується (на 31% при дозі АХ  $1 \times 10^{-7}$  М), а це призводить до зменшення відношення піруват/лактат, яке відображає цитоплазматичне відношення НАД/НАДН.

13. Дія ацетилхоліну на гліюконеогенез в ізолюваній перфузованій печінці. Ми припустили, що активація гідролізу АТФ під дією АХ зумовлена стимуляцією в печінці гліюконеогенезу, який потребує значного енергетичного забезпечення. З метою в'яснення впливу АХ на гліюконеогенез у перфузований розчин додавали лактат і піруват - субстрати для гліюконеогенезу. Результати досліджень показали, що як додавання в перфузат лактату і пірувату, так і АХ ( $1 \times 10^{-7}$  М) викликало стимуляцію швидкості поглинання кисню. Вимірювання концентрації глюкози в пробах, взятих через кожні 5 хв від початку експерименту із витоку від печінки, вказало на те, що продукція глюкози достовірно зростає як у випадку додавання лактату і пірувату, так і АХ. В окремих експериментах тканину печінки заморожу-

вали для визначення вмісту глікогену. Виявилось, що вміст глікогену зростає під впливом АХ паралельно із збільшенням продукції глюкози.

Ефект АХ реалізується через М-холінорецептори, оскільки їх блокада атропіном повністю усуває стимулюючий ефект медіатора на продукцію глюкози (рис.10, 2). На користь того, що зростання концентрації глюкози обумовлено її утворенням у процесі гліконеогенезу, а не внаслідок розпаду глікогену, свідчить той факт, що амінооксиацетат усуває стимулюючий ефект АХ (рис.10, 3). А як відомо, амінооксиацетат перериває шлях утворення глюкози з лактату (Cederbaum et al., 1973).

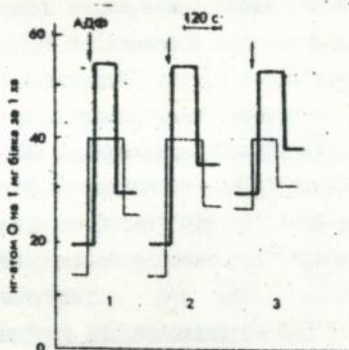
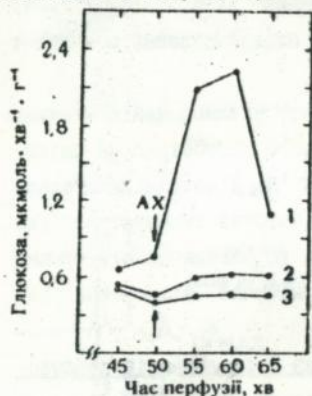


Рис.10. Усунення атропіном (2) і амінооксиацетатом (3) стимулюючого ефекту АХ ( $5 \times 10^{-7} \text{M}$ ) на продукцію глюкози з лактату (1) в ізольованій перфузованій печінці.

Рис.11. Вплив АХ ( $1 \times 10^{-7} \text{M}$ ) на окислення  $\alpha$ -кетоглутарату (1), глутамату і малату (2) і сукцинату (3) в МХ, виділених з ізольованої перфузованої печінки щура.

Одночасно із реєстрацією швидкості поглинання кисню і продукції глюкози ми проводили вимірювання концентрації аденілових нуклеотидів методом ядерно-магнітно резонансної спектроскопії. Вивчення  $^{31}\text{P}$ -ЯМР спектрів, одержаних з ізольованої перфузованої

печінки, показало, що всі три піки АТФ значно зменшуються під впливом АХ ( $1 \times 10^{-6} \text{M}$ ). В цих умовах амінооксиацетат і верапаміл повністю усувають ефект АХ.

14. Регуляція ацетилхоліном дихання і окисного фосфорилування в мітохондріях, виділених із ізольованої перфузованої печінки. На рис. 11 представлені результати досліджень впливу введеного в перфузат АХ на дихання і окисне фосфорилування в МХ, виділених із ізольованої перфузованої печінки. Видно, що АХ призводить, як і при його введенні в організм, до значної активації АДФ-стимульованого дихання при окисненні  $\alpha$ -кетоглутарату. Істотною особливістю такої активації є значне підвищення ефективності окисного фосфорилування. Коефіцієнт АДФ/О при окисненні  $\alpha$ -кетоглутарату зростає на 40%. Значно скорочений і час фосфорилування доданої АДФ. Коефіцієнт АДФ/ $\Delta t$  зростає на 90%. Наступним аспектом порівняння дії АХ при його введенні на рівні організму і при додаванні в перфузат, є його вплив на окислення суміші глутамату з малатом, що забезпечує включення переамінування глутамату з утворенням  $\alpha$ -кетоглутарату в аспартатамінотрансферазній реакції. Із рисунка видно, що АХ, як і при його введенні *in vivo*, призводить до активації АДФ-стимульованого дихання при окислення суміші глутамату з малатом. Однак, на ізольованій печінці не спостерігається гальмівного впливу АХ на окислення сукцинату. При окисненні цього субстрату проявляється навіть активація АДФ-стимульованого дихання. Проте, в даному випадку не відмічається достовірних змін в інтенсивності (АДФ/ $\Delta t$ ) і ефективності (АДФ/О) окисного фосфорилування.

15. Вплив внутрішньовенного введення ацетилхоліну на флюоресценцію НАДН і швидкість поглинання кисню тканиною серця собаки. Результати досліджень показали, що АХ, введений в організм, викликає двохфазну зміну флюоресценції НАДН в серці (рис. 12): короткочасне (5-10 хв.) підвищення флюоресценції НАДН протягом

ін'єкції АХ і довготривале (35-50 хв.) зниження флуоресценції НАДН (окислення піридиннуклеотидів) після припинення введення АХ. Одночасна реєстрація артеріального тиску показала, що його зниження відбувається тільки протягом ін'єкції АХ, а зразу ж за її припинення цей показник повертається до норми. Останнє, очевидно, вказує на те, що метаболічний ефект АХ значно більш пролонгований в часі, ніж його дія на механічні параметри.

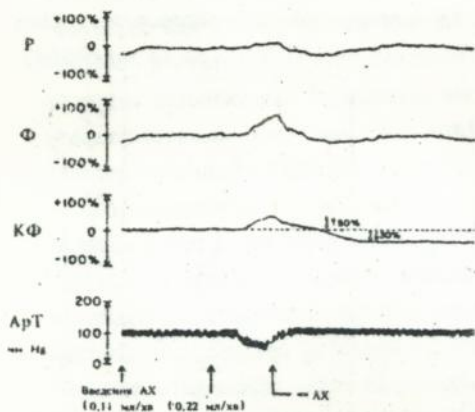


Рис. 12. Вплив введеного АХ на флуоресценцію НАДН в тканині лівого шлуночка серця собаки. Скорочені позначення: Р - рефлексія; Ф - флуоресценція; КФ - коректована флуоресценція (КФ = Ф - Р); АрТ - артеріальний тиск.

Визначення напруження кисню в крові, взятої з стегнової артерії, показало, що АХ призводить до зниження  $PO_2$ , як під час його введення, так і після припинення ін'єкції, і цей ефект також триває в часі 35-50 хв. Визначення швидкості поглинання кисню по методу Рука і Фейла (Rooke, Feigl, 1982) показало, що як під час введення АХ, так і через 15 хв. після припинення має місце зниження споживання кисню. Ефект більш виражений при ін'єкції низьких концентрацій АХ (0.22 мл  $1 \times 10^{-6}$  М АХ за 1 хв.). Із збільшенням концентрації АХ цей ефект зменшується і відсутній при високій концентрації медіатора (0.22 мл  $1 \times 10^{-4}$  М АХ за 1 хв.). Це, очевидно, зв'язано з виділенням серця при високих дозах АХ катехоламінів (Sabrega et al., 1966) або давно відомим у фізіології явищем

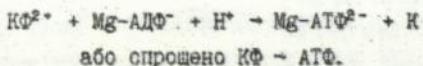
вискоязування серця з під впливу блукаючого нерва (Higgins et al., 1973). Звертає на себе увагу той факт, що незважаючи на зниження напруження кисню в крові і зменшення його поглинання серцем після припинення ін'єкції АХ, флюоресценція НАДН зсувається в сторону окислених форм. Ці дані добре узгоджуються з даними С.К.Гордія і співавторів (1977), які вказують на зниження  $P_{O_2}$  і підвищення окисно-відновного потенціалу (превалювання окислених форм) в тканині слизової оболонки шлунка під впливом АХ.

Внутрішньовенне введення тваринам норадреналіну призводить до зменшення флюоресценції НАДН (окислення піридиннуклеотидів) і проходить на фоні підвищення артеріального тиску і тиску у лівому шлуночку серця. При цьому швидкість поглинання кисню серцем собаки зростає на 52%.

Таким чином, як після ін'єкції АХ, так і норадреналіну відбувається окислення піридиннуклеотидів, що може вказувати на активацію в обидвох випадках окисних процесів в клітинах. Однак, відмінність у дії двох медіаторів полягає у різнонаправленій дії на швидкість споживання кисню тканиною серця, що, очевидно, зумовлено активацією обміну в МХ двох різних енергетичних субстратів -  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату, окислення яких обумовлює різну ефективність окисного фосфорилування.

16. Вплив ацетилхоліну на параметри креатинкіназної реакції в серці собаки, вимірної  $^{31}\text{P}$ -ЯМР. При вимірюванні  $^{31}\text{P}$ -ЯМР спектрів з серця собаки нами не було виявлено достовірних змін в концентраціях креатинфосфату (КФ), АТФ, АДФ, і  $\text{P}_i$ . Очевидно, в організмі сильно виражені процеси гомеостазу рівня макроергів. Відомо, що рівень АТФ у міокарді підтримується постійним завдяки двом хімічним реакціям: 1) синтезу АТФ в процесі окисного фосфорилування в МХ - найбільш потужне джерело синтезу АТФ у серці; 2) ресинтез АТФ в креатинкіназній реакції, в процесі якої високо енергізована фосфатна група з КФ переноситься на АДФ з утворенням АТФ. Креатинкіназний ресинтез АТФ є досить оперативним, значно

зростає за умов гідролізу АТФ і може відіграти значну роль у підтриманні гомеостазу АТФ (Bittl, Ingwall, 1965). На субклітинному і органному рівнях нами було показано, що синтез АТФ у процесі окисного фосфорилування зростає під впливом АХ. Інший шлях - ресинтез АТФ в процесі креатинкіназної реакції, ми дослідили методом  $^{31}\text{P}$  ЯМР. Зокрема, ми вивчили такі параметри креатинкіназної реакції, як константа цієї реакції ( $K_r$ ) і відносне утворення АТФ з КФ, яке дорівнює добутку  $K_r \times M_0 \text{КФ}$ , де  $M_0 \text{КФ}$  - початкова концентрація КФ (Spenser et al., 1988). Ця реакція проходить згідно з рівнянням:



Результати досліджень показали, що як константа швидкості креатинкіназної реакції  $K_r$ , так і перетворення КФ - АТФ, виміряне по  $K_r \times M_0 \text{КФ}$ , знижується як протягом, так і після ін'єкції АХ. На відміну від АХ норадреналін приводить до зростання  $K_r$ , а також  $K_r \times M_0 \text{КФ}$ .

Одержані дані можуть вказувати на те, що синтез АТФ в процесі окисного фосфорилування, очевидно, є достатнім для забезпечення енергією стимульованих АХ відновних процесів. При дії норадреналіну активується як синтез АТФ у МХ (Кулинский и др., 1976; Бабский, Шостаковская, 1984), так і його ресинтез в креатинкіназній реакції.

17. Холінергічний статус організму і підвищення ефективності спряження дихання і фосфорилування в мітохондріях печінки в процесі адаптації тварин до гіпоксії. Відомо, що вміст АХ значно вищий, а холінестеразна активність нижча у високорезистентних тварин у порівнянні з низькорезистентними (Вадзюк, 1983). Враховуючи ці дані, ми дослідили динаміку змін в окисленні енергетичних субстратів у процесі адаптації тварин до гіпоксичної гіпоксії (7000м) і співставили з вмістом АХ в різних тканинах.

На рис. 13 представлена динаміка змін дихання і окисного фосфорилування в МХ печінки щура у порівнянні із змінами вмісту аце-

тилхоліну в тканині печінки, серця і підшлункової залози шурів. Видно, що в перші два дні адаптації тварин до гіпоксії має місце активація окислення в мітохондріях сукцинату (1), що проявляється в істотному підвищенні швидкості АДФ-стимульованого дихання при окисленні цього субстрату. В той же час не спостерігається достовірних змін в окисленні НАД-залежного субстрату  $\alpha$ -кетоглутарату (2), а також інших НАД-залежних субстратів. Одночасно зменшується

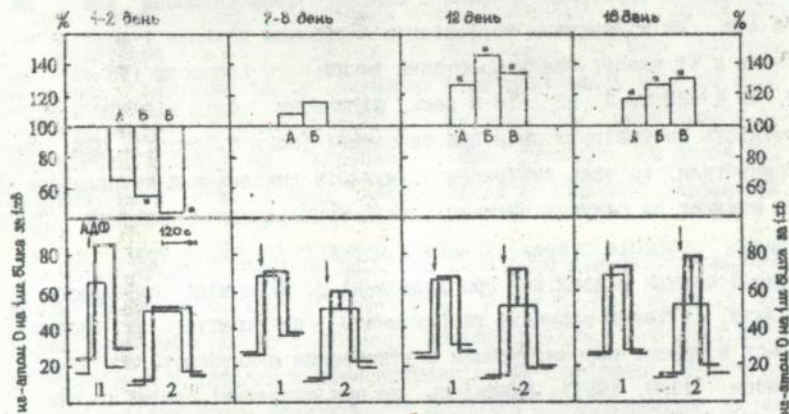


Рис. 13. Порівняльний аналіз змін вмісту АХ в тканинах печінки (А), серця (Б) і підшлункової залози (В) із змінами в окисленні сукцинату (1) і  $\alpha$ -кетоглутарату (2) в МХ печінки в процесі адаптації шурів до гіпобаричної гіпоксії.

вміст ацетилхоліну в тканинах печінки (а), серця (б) і підшлункової залози (в), що очевидно вказує на превальвання активності в даний період симпатoadреналової системи. Однак, починаючи з 7-го дня адаптації зазначені процеси істотним чином змінюються: в тканинах печінки і серця значно збільшується вміст ацетилхоліну, а в мітохондріях розвивається активація окислення іншого субстрату ЦТК -  $\alpha$ -кетоглутарату. Характерна для перших днів адаптації активація окислення сукцинату відсутня, а в деяких експериментах спостерігається гальмування його окислення. Стимуляція АДФ-сти-

мульованого дихання при окисленні  $\alpha$ -кетоглутарату на 7, 12 і 16-й день адаптації становить 16, 38 і 46 %, відповідно. Із рисунку 13 видно, що в МХ печінки адаптованих до гіпоксії щурів значно зменшений час фосфорилування доданої АДФ при окисленні  $\alpha$ -кетоглутарату, що відображається в значному підвищенні інтенсивності (АДФ/Δt) окисного фосфорилування (154%, 12-й день адаптації). Важливою стороною змін енергетичного обміну є значне підвищення коефіцієнта спряження дихання і окисного фосфорилування АДФ/О на 30-40%. На підвищення коефіцієнта спряження дихання і фосфорилування в МХ вказує також зростання дихального контролю ( $V3/V4$ ) на 9, 45 і 53% на 7, 12 і 16-й день, відповідно. Слід відмітити відсутність достовірних змін при окисленні інших субстратів ЦТК. Ми припустили, що така вибіркова стимуляція окислення  $\alpha$ -кетоглутарату можлива за рахунок активації амінотрансферазних реакцій. Про участь процесів переамінування в процесі адаптації тварин до гіпоксії судили в дослідях при додаванні до МХ суміші глутамату і малату, а також пірувату та глутамату - субстратів, які включаються в процес переамінування з утворенням  $\alpha$ -кетоглутарату (Кондрашова, 1989, 1991). Виявилось, що при окисленні суміші пірувату і глутамату, а також глутамату і малату спостерігається чітка активація АДФ-стимульованого дихання, яка повністю усувається інгібітором переамінування - амінооксиацетатом. Очевидно, що в даному випадку амінооксиацетат перериває амінотрансферазний шлях утворення  $\alpha$ -кетоглутарату, а як було показано вище, окислення саме цього субстрату активується на 7-16 день адаптації тварин до гіпоксії.

Таким чином, виявлені в процесі адаптації тварин до гіпоксії зміни в нейрогуморальному статусі організму корелюють із змінами окислення субстратів в мітохондріях. Очевидно, в перші дні адаптації гіпоксійний фактор виступає для тварин стресорним з підвищенням активності симпатoadреналової системи. В цей період має місце активація окислення сукцинату - субстрату, який активується під впливом катехоламінів (Бабский и др., 1985) і який забезпечує

підвищення синтезу АТФ при зниженому к.к.д. (ефективність окисного фосфорилування при цьому знижується). Однак при багаторазовому повторенні впливу гіпоксійного фактора розвивається пристосування енергетичного обміну до нестачі кисню, яке виражається на рівні МХ у підвищенні спряження дихання і фосфорилування. Механізм цього явища полягає в наступному: "шунтуванні" циклу трикарбонових кислот за рахунок активації амінотрансферазних реакцій і вибіркової активації окислення  $\alpha$ -кетоглутарату, що призводить до включення в роботу всіх пунктів спряження. Як нами було вище показано, інтенсифікація окислення  $\alpha$ -кетоглутарату веде до посилення субстратного фосфорилування і синтезу ГТФ, необхідного для синтетичних анаболічних процесів. З цим, очевидно, зв'язане підвищення ваги тіла тварин, адаптованих до гіпоксії (Аршавский, 1982).

Одержані дані вказали на чітку кореляцію між вмістом ацетилхоліну та окисленням  $\alpha$ -кетоглутарату, а також зв'язаним з ним підвищенням ефективності окисного фосфорилування. Цей факт добре узгоджується з виявленою нами активацією АХ окислення  $\alpha$ -кетоглутарату і підвищенням ефективності окисного фосфорилування. Останнє вказує на важливу роль АХ у формуванні неспецифічної адаптаційної реакції організму до дії гіпоксійного фактора через вплив на енергетичні процеси в МХ його клітин.

18. Вплив  $\alpha$ -кетоглутарату на і адаптації тварин до гіпоксичної гіпоксії на постстресорні зміни енергетичного обміну в мітохондріях міокарду. Відомо, що у стресорних ситуаціях, зокрема при іммобілізаційному стресі, розвивається гіперактивація окислення сукцинату (Кондрашова, Григоренко, 1981, 1985). Це відбувається внаслідок викиду в кров великої кількості катехоламінів, а як відомо, катехоламіни стимулюють окислення в МХ сукцинату (Бабський и др., 1985). Гіперактивація окислення сукцинату стимулює механізми самообмеження ефекту, зокрема відбувається нагромадження оксалоацетату - метаболіту, який обмежує окислення сукцинату (Кондрашо-

ва. Григоренко, 1981, 1985). Поряд з активацією окислення сукцинату має місце поглинання МХ великої кількості кальцію (Гайнутдинов, Абибова, 1985), що може викликати роз'єднання спряження дихання і фосфорилування в МХ (Dreels, Baumgucker, 1982). Вказані зміни призводять до порушення енергетичного обміну в МХ. У зв'язку з цим актуальною є проблема пошуку речовин і методів, що запобігають стресорним пошкодженням дихання і окисного фосфорилування в МХ.

Одержані нами результати вказали, що і введення тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату Na, і адаптація тварин до гіпоксичної гіпоксії призводять до значного зростання спряження дихання і фосфорилування в МХ. Крім цього, в умовах роз'єднуючої дії сильних стресорних впливів на спряження дихання і фосфорилування істотну роль може відіграти активований в обох випадках процес субстратного фосфорилування і синтез ГТФ. Враховуючи це, ми дослідили роль попередньої адаптації тварин до гіпоксичної гіпоксії (7000 м., 12 днів по 4 год.), а також триденного введення тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату Na на постстресорні зміни енергетичного обміну в МХ міокарда. На рис.14. А представлені діаграми дихання МХ контрольних тварин (тонка лінія), тварин, підданих 24-годинному імобілізаційному стресу (лінія середньої товщини), а також адаптованих до гіпоксичної гіпоксії (7000 м., 12 днів по 4 год.) щурів, які після цього піддавалися 24-годинному імобілізаційному стресу (товста лінія). Видно, що імобілізаційний стрес призводить до гальмування окислення сукцинату. Це гальмування зв'язано з нагромадженням оксалоацетату, оскільки усувається додаванням до МХ ізоцитрату та глутамату (2 і 3). Інша картина спостерігається у попередньо адаптованих до гіпоксії щурів. Імобілізаційний стрес не призводить до гальмування окислення сукцинату, а, навпаки, спостерігається активація його окислення. При цьому активація окислення сукцинату не знаходиться в гіперактивному стані, оскільки не призводить до нагромадження в МХ оксалоацетату. Додавання до МХ міокарду активаторів сукцинатдегідрогенази ізоцитрату і глутамату

не підвищує, а навіть знижує АДФ-стимульоване дихання МХ (2 і 3).

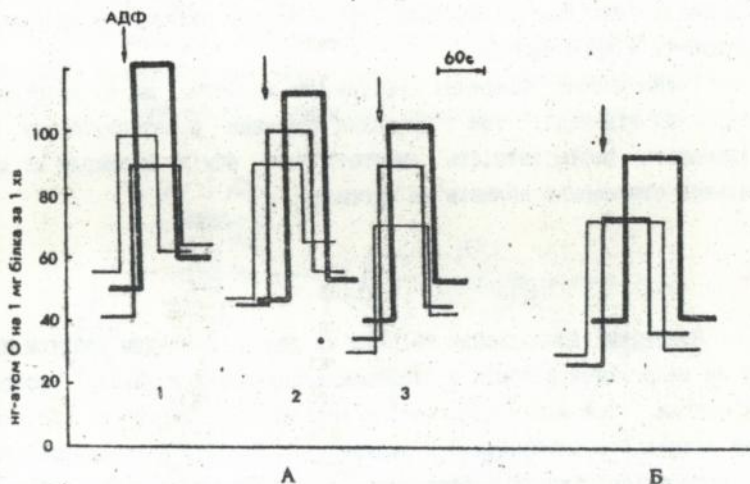


Рис. 14. Вплив попередньої адаптації тварин до гіпоксичної гіпоксії (А) і триденного введення  $\alpha$ -кетоглутарату Na (Б) на пост-стресорні зміни дихання МХ міокарду щура. Тонка лінія - МХ контрольних тварин; середня - 24-год. іммобілізаційний стрес; товста - адаптація тварин до гіпоксії або введення  $\alpha$ -кетоглутарату Na + 24-годинний іммобілізаційний стрес. А, 1 - сукцинат; 2 - сукцинат + ізоцитрат; 3 - сукцинат + глутамат; Б - сукцинат.

Такий же ефект ми спостерігали раніше при дії АХ.

Очевидно, за умов попередньої адаптації тварин до гіпоксії, окислення сукцинату не переходить в гіперактивний (загальмований оксалоацетатом) стан. Останнє надзвичайно важливе для повноцінного енергетичного забезпечення функціональної активності організму за умов дії сильних стресорних подразників.

Така ж сама закономірність проявляється і при попередньому

триденному поїнні тварин  $\alpha$ -кетоглутаратом Na. Як видно з рис.14. Б тварини, що одержували  $\alpha$ -кетоглутарат Na реагують у відповідь на імобілізаційний стрес чіткою активацією окислення сукцинату в МХ міокарду.

Таким чином, одержані результати вказали, що як адаптація тварин до гіпоксії, так і введення тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату Na підвищують резистентність енергетичного обміну міокарду до дії сильних стресорних впливів на організм.

\* \* \*

Проведені дослідження вказали на те, що основним ефектом дії АХ на енергетичний обмін є підвищення спряження дихання і фосфорилування. Цей ефект досягається декількома шляхами: а) вибірковою активацією окислення НАД-залежного субстрату  $\alpha$ -кетоглутарату; б) активацією амінотрансферазного шляху утворення цього субстрату; в) гальмуванням найбільш інтенсивно окислювального субстрату сукцинату ГТФ, синтез якого активується АХ-ом у процесі субстратного фосфорилування. Результати досліджень вказали на існування сильного регуляторного зв'язку між дією АХ і  $\alpha$ -кетоглутарату на рівні організму. Виявилось, що не тільки АХ викликає активацію окислення і утворення  $\alpha$ -кетоглутарату, але і введення тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату призводить до підвищення рівня АХ у крові і тканинах організму. Ці дані свідчать про існування медіаторно-субстратно-нуклеотидної системи: АХ -  $\alpha$ -кетоглутарат - ГТФ (АТФ) - цГМФ, яка забезпечує енергією індуковані АХ-ом анаболічні відновні процеси в клітинах і яка реципрокна іншій системі: катехоламіни - сукцинат - АТФ - цАМФ (Кондрашова и др., 1985). Остання система забезпечує енергією стан підвищеної функціональної активності, пов'язаний з вивільненням катехоламінів і активацією катаболічних процесів. Дані про вибіркоче підсилення окислення метаболітів циклу Кребса узгоджуються із сучасними даними про структурно-кінетичну організацію внутрішньомітохондріальних мультифер-

ментних комплексів (Любарев, Курганов, 1987, 1989) і відповідають імпульсному режиму переходу від спокою до активності клітин і тканин в організмі, що запускається виділенням гормонів і медіаторів. У випадку дії АХ активація холінорецептора призводить до стимуляції  $\alpha$ -кетоглутаратдегідрогенази і окислення  $\alpha$ -кетоглутарату (рис.15). Цей ефект, очевидно, реалізується через іони  $\text{Ca}^{2+}$ .

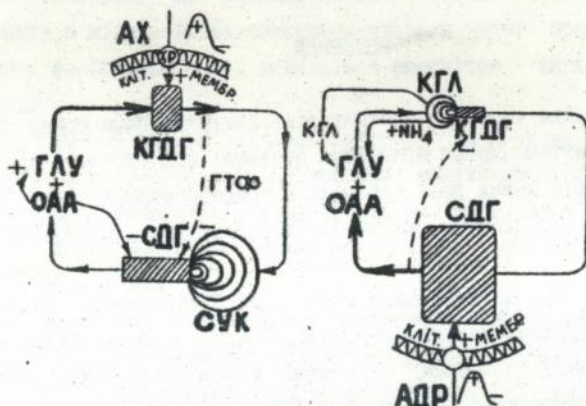


Рис.15. Схема переключення окислення двох енергетичних субстратів -  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату при зміні нейрогуморального тону в організмі. XR і AR - холіно- і адренорецептори. Товста лінія - інтенсивне окислення, тонка - загальмоване окислення. Розміри заштрихованих прямокутників умовно символізують активність КГДГ і СДГ, а радіальні лінії біля них - концентрації сукцинату і  $\alpha$ -кетоглутарату.

Швидкість окислення сукцинату при цьому знижується внаслідок гальмування гуаніловими нуклеотидами і відбувається нагромадження цього субстрату. Однак, після активації холінорецептора настає його десенсибілізація, а в організмі наростає рівень катехоламінів, які активують окислення сукцинату (Бабский и др., 1985).

Здатність МХ до швидкого переключення окисних процесів на використання різних субстратів відповідає швидким змінам у коливаннях нейрогуморального тону організму. Таким чином, взаємозв'язок між нейротрансмітерами і енергетичними субстратами призводить до адекватного енергетичного забезпечення реципрокних фізіологічних станів клітин та органів організму - спокою і активності.

### ВИСНОВКИ

1. Введення тваринам ацетилхоліну викликає реципрокну зміну окислення в мітохондріях міокарду, печінки, підшлункової залози і слизової тонкої кишки двох субстратів трикарбонного циклу  $\alpha$ -кетоглутарату і сукцинату - активацію і гальмування, відповідно. В обох випадках підвищується ефективність спряження дихання та фосфорилування. Вказана дія ацетилхоліну підсилюється введенням тваринам інгібітора холінестерази прозерину, а також більш виражена в мітохондріях тканин, які перебувають під більш сильним впливом парасимпатичної нервової системи і в тварин з більш вираженим холінергічним статусом організму. Дія ацетилхоліну на окислення вказаних субстратів специфічна, оскільки не виявляється при окисленні інших субстратів трикарбонного циклу.

2. Найбільш виражений ефект введеного з організм ацетилхоліну проявляється в мітохондріях серця через 15 хв, а в мітохондріях печінки - через 30 хв після введення. На 60 хв швидкість дихання і показники окисного фосфорилування нормалізуються.

3. Встановлено стимулюючий вплив ацетилхоліну на спряжене з окисленням  $\alpha$ -кетоглутарату субстратне фосфорилування в мітохондріях печінки щура і морської свинки, яке більш виражене у морської свинки - тварини з вищим холінергічним статусом у порівнянні з щуром.

4. Показана участь іонів кальцію в реалізації дії введеного тваринам ацетилхоліну на енергетичні процеси в мітохондріях, на що вказує підвищення цитоплазматичної концентрації кальцію в

ізолюваних гепатоцитах, зростання швидкості транспорту катіона в мітохондрії і збільшення кальцієвої ємності виділених органел після введення тваринам ацетилхоліну.

5. Встановлено, що поряд з активацією окислення  $\alpha$ -кетоглутарату, ацетилхолін стимулює амінотрансферазний шлях утворення цього субстрату в мітохондріях.

6. Виявлено, що гальмівний вплив ацетилхоліну на окислення сукцинату в мітохондріях опосередковується через продукти субстратного фосфорилування і усувається арсенітом - інгібітором синтезу ГТФ.

7. Основний ефект дії ацетилхоліну, що полягає в стимуляції окислення  $\alpha$ -кетоглутарату і підвищенні ефективності спряження дихання і фосфорилування, відтворений на ізолюваній перфузованій печінці. Це свідчить про прямий вплив ацетилхоліну на енергетичні процеси в клітинах.

8. Показана стимулююча дія ацетилхоліну на глюконеогенез і синтез глікогену в ізолюваній перфузованій печінці.

9. Вплив введеного в організм ацетилхоліну на дихання та окисне фосфорилування в мітохондріях печінки опосередковується через М-холінорецептори, оскільки знімається холіноблокатором атропіном, а в мітохондріях серця через М- та Н- холінорецептори, оскільки усувається при спільній дії атропіну та бензогексонію.

10. Виявлено синергізм у дії введених в організм ацетилхоліну і  $\alpha$ -кетоглутарату  $\text{Na}$  на дихання і окисне фосфорилування в мітохондріях серця і печінки. Показано підсилення ефекту дії ацетилхоліну при його сумісному введенні з  $\alpha$ -кетоглутаратом  $\text{Na}$ .

11. Встановлено, що введення тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату  $\text{Na}$  призводить до зниження холінестеразної активності в крові і збільшення вмісту ацетилхоліну в тканинах печінки і підшлунковій залозі, що свідчить про існування сильного регуляторного зв'язку між дією ацетилхоліну і  $\alpha$ -кетоглутарату на рівні організму.

12. В умовах *in vivo* показано, що внутрішньовенне введення ацетилхоліну викликає окислення піридиннуклеотидів у тканині міо-

карду собаки, яке вказує на активацію окисних процесів у клітинах. Ці медіатори спричиняють різнонаправлену дію на швидкість поглинання кисню: підвищення у випадку введення норадреналіну і зниження у випадку ацетилхоліну.

13. Показано, що підвищення холінергічного тонуусу в процесі адаптації тварин до гіпоксичної гіпоксії викликає активацію окислення в мітохондріях печінки  $\alpha$ -кетоглутарату і значне зростання спряження дихання і фосфорилування.

14. Виявлено, що попередня адаптація тварин до гіпоксії, а також введення тваринам  $\alpha$ -кетоглутарату Na підвищує резистентність енергетичного обміну міокарду до дії сильних стресорних навантажень на організм.

Список основних публікацій по дисертації:

1. Гордий С.К., Долиба Н.М., Музыка Ф.В., Мурашук М.М. О роли адрено- и холинорецепторов в регуляции интенсивности поглощения кислорода изолированными секреторными клетками //Нейрогуморальная регуляция клеточных механизмов секреторного процесса: Вест. Львов. ун-та. Сер. биол. - 1985 - Вып. 16. - С. 34-47.

2. Гордий С.К., Долиба Н.М., Музыка Ф.В., Мурашук М.М. Реципрокное взаимодействие адрено- и холинорецепторов в регуляции интенсивности и эффективности дыхания секреторных клеток //Структурные и функциональные свойства биологических систем: Докл. МОИП. - 1985. - С. 77-80.

3. Кондрашова М.Н., Андреев А.А., Бабский А.М., Долиба Н.М. и др. Реципрокные саморегулирующиеся гормонально-субстратные системы: катехоламины-сукцинат, антагонисты катехоламинов -  $\alpha$ -кетоглутарат //Физиология и биохимия медиаторных процессов: Тез. докл. IV Всесоюзн. конф., посвящен. 85-летию со дня рожд. Х.С. Коштоянца. - Москва, 1985. - С. 160.

4. Шостаковская И.В., Долиба Н.М., Гордий С.К., Бабский А.М., Кондрашова М.Н. Активация ацетилхолином окисления  $\alpha$ -кетоглутарата в митохондриях печени //Укр. биохим. журн. - 1986. - Т. 58, N5. - С. 54-61.

5. Гордий С.К., Долиба Н.М., Музыка Ф.В., Мурашук М.М. Влияние ацетилхолина на интенсивность поглощения и эффективное использование кислорода изолированными клетками и митохондриями

секреторных тканей // XIV Всесоюз. конф. по физиологии пищеварения и всасывания: Тез. докл. - Тернополь-Львов, 1986. - С. 91-92.

6. Гордій С.К., Долиба М.М., Мурашук М.М. Медіаторна регуляція ефективності окисних процесів в секреторних тканинах // XII Український фізіологічний з'їзд: Тез. доп. - Львів, 1986. - С. 94.

7. Шостаковская И.В., Долиба Н.М. Высокая чувствительность к ацетилхолину энергетического обмена в митохондриях поджелудочной железы // Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена: Тез. докл. Всесоюз. симпоз. - Пущино, 1986. - С. 146-147.

8. Долиба Н.М., Кондрашова М.Н., Шостаковская И.В. Усиление субстратного фосфорилирования в зависимости от холинергического статуса животного // Вопросы эволюционной физиологии: Тез. докл. - Ленинград, 1986. - С. 84.

9. Бабский А.М., Долиба Н.М., Кондрашова М.Н. Попеременность активации окисления субстратов в цикле Кребса, индуцируемая катехоламинами и ацетилхолином // Вопросы эволюционной физиологии: Тез. докл. - Ленинград, 1986. - С. 28.

10. Бабский А.М., Григоренко Е.В., Долиба Н.М. Реципрокные саморегулирующиеся гормонально-нуклеотидные системы: катехоламины-сукцинат-аденилат; ацетилхолин- $\alpha$ -кетоглутарат-гуанилаты // Здоровье человека в Сибири: Тез. докл. - Красноярск, 1986. - С. 50-51.

11. Долиба Н.М. Холинергическая регуляция окислительного фосфорилирования и кальциевой емкости митохондрий печени // Структурные и функциональные свойства биологических систем: Докл. МОИП. - 1986. - С. 94-95.

12. Долиба Н.М., Маевский Е.И., Кондрашова М.Н. Полярнографическая регистрация субстратного фосфорилирования и его регуляция ацетилхолином // Молекулярные механизмы и регуляция энергетического обмена: Тез. докл. Всесоюз. симпоз. - Пущино, 1986. - С. 124.

13. Шостаковська І.В., Бабський А.М., Долиба М.М. Значення катехоламінів і ацетилхоліну в регуляції субстратного забезпечення енергетичних процесів у секреторних клітинах // V Укр. біохім. з'їзд: Тез. доп. - Івано-Франківськ, 1987. - Ч. 2. - С. 316.

14. Шостаковская И.В., Бабский А.М., Гринькив М.Я., Долиба Н.М., Клевец М.Ю. О роли кальция в функционировании секреторных клеток пищеварительных желез // XV съезд Всесоюз. физиол. общ. им. И. П. Павлова: Тез. докл. - Кишинев, 1987. - Т. 2. - С. 489.

15. Долиба Н.М. Холинергическая регуляция энергетического обеспечения функциональной активности пищеварительных желез //

Секреция пищеварительных желез в норме и патологии: Тез. докл. - Андижан, 1988. - С. 76.

16. Шостаковская И.В., Долиба Н.М. Холинергическая регуляция энергетического обмена в митохондриях секреторных органов // Нейрогуморальная регуляция клеточных механизмов секреторного процесса: Весн. Львов. университета, 1989. - Вып. 19. - С. 3-17.

17. Шостаковская И.В., Гордий С.К., Долиба Н.М., Бабский А.М., Гринькив М.Я. Возможность коррекции энергетического обеспечения функций секреторных клеток через медиаторно-субстратную систему // Научно-методические аспекты физиологии: Рекомендации для студентов и научных сотрудников-физиологов. - Львов, 1989. - С. 39-40.

18. Бабский А.М., Дбаг Марван, Долиба Н.М., Кондрашова М.Н., Шостаковская И.В. Реципрокное действие адреналина и ацетилхолина на окисление субстратов в миокарде // VII Всесоюз. конф. по биохимии мышц: Тез. докл. - Тбилиси, 1989. - С. 18-19.

19. Долиба Н.М., Кургалюк Н.Н., Романык О.В., Шостаковская И.В. Влияние карбохолина на пострadiационные изменения дыхания и окислительного фосфорилирования в митохондриях гепато- и энтероцитов // I Всесоюз. радиобиологический съезд: Тез. докл. - Москва, 1989. - Т. 5. - С. 1026-1027

20. Kondrashova M.N., Doliba N.M. Polarographic observation of substrate-level phosphorylation and its stimulation by acetylcholine // FEBS Letters, 1989. - V. 243, N2. - P. 153-155.

21. Babsky A.M., Doliba N.M., Kondrashova M.N., Shostakovskaya I.V. Interaction of neurotransmitters and substrates of oxidation // Signal molecules and mechanisms of animal behaviour: Symposium abstracts. - Pushchino, 1989. - P. 8.

22. Ivanics T., Doliba N.M., Ivanics K., Osbakken M. Effects of vasoactive agents on myocardial metabolic function // Magnetic Resonance Imaging. - 1989. - P. 1920.

23. Osbakken M., Blum H., Doliba N.M., Ivanics T., Duska C., Zhang D., Ponomarenko I. Mechanisms of myocardial functional stability during pathophysiological insult. // Supplement to Circulation. - 1989. - V. 80, N4. - P. 587.

24. Дбаг Марван, Долиба Н.М., Бабський А.М. Вплив ацетилхоліну і адреналіну на дихання та окисне фосфорилування в мітохондріях серця // XII з'їзд Укр. фізіол. т-ва ім. І.П.Павлова: Тез. доп. - Харків, 1990. - Т. 1. - С. 88-89.

25. Музыка Ф.В., Долиба М.М., Кургалюк Н.М. Синергічна дія ацетилхоліну і  $\alpha$ -кетоглутарату на енергетичні процеси в мітохондріях печінки // XII з'їзд Укр. фізіол. т-ва ім. І.П.Павлова: Тез. доп. - Харків, 1990. - Т.2. - С.35-36.

26. Долиба Н.М., Гордий С.К., Дбаг Марван, Музыка Ф.В. Действие ацетилхолина на трансаміназний путь окисления субстратов в митохондриях // Физиология и биоэнергетика гипоксии: Тез. докл. - Пушкино, 1990. - С.49-50.

27. Долиба Н.М., Дбаг Марван, Кондрашова М.Н., Шостаковская И.В. Модификация норадреналином влияния ацетилхолина на окислительные процессы в митохондриях миокарда // Физиология и биохимия медиаторных процессов: Тез. докл. V Всесоюз. конф., посвященной 90-летию со дня рожд. Х.С. Коштоянца. - Москва, 1990. - С.96.

28. Babsky A.M., Doliba N.M., Shostakovskaya I.V. Regulation of succinate and  $\alpha$ -ketoglutarate oxidation into mitochondria by adrenaline and acetylcholine // VI-th European Bioenergetic conference. Short reports. - Netherland, 1990. - P.92.

29. Ikai I., Okuda M., Doliba N., Chance B. Rate of ATP synthesis in the perfused rat liver by  $^{31}\text{P}$  cryo - NMR // Journal Biological Chemistry - 1990. - V.265, N.36. - P. 22097-22100.

30. Osbakken M., Doliba N., Mitchel M.D., Ivanics T., Zhang D., Maevsky A. Acetylcholine: is it a myocardial metabolic regulator? // Journal of Applied Cardiology. - 1990. - V.5. - P.357-366.

31. Ivanics T., Doliba N., Megyeri K., Dezli L., Osbakken M. Do vasoactive agents regulate myocardial redox state? // Journal of Applied Cardiology. - 1991. - V.6. - P.283-290.

32. Ivanics T., Osbakken M., Dezli L., Doliba N., Megyeri K. Effects of vasoactive agents on myocardial bioenergetics // Journal of Applied Cardiology. - 1991. - V.6. - P.211-220.

33. Osbakken M., Blum H., Wang D.-J., Doliba N., Ivanics T., Zhang D., Maevsky A. In vivo mechanisms of myocardial functional stability during physiological interventions // Cardiology. - 1991. - V.79. - P.1-13.

34. Долиба Н.М., Коробов В.М., Телегус Я.В., Болдырев О.О. Роль карнозину в адаптації тварин до гіпоксії // VI Укр. біохім. з'їзд: Тез. доп. - Київ, 1992. - С.183.

35. Ємчик Н.М., Дбаг Марван, Долиба М.М. Ацетилхолін та ефективність окисного фосфорилування в мітохондріях міокарда //

VI Укр. біохім. з'їзд: Тез. доп. - Київ, 1992. - С. 182.

36. Шостаковская И.В., Бабский А.М., Горинь О.В., Долиба Н.М., Музыка Ф.В. Субклеточные механизмы реализации холин- и ад- ренергических влияний в пищеварительных железах и миокарде // Проблемы физиологии гипоталамуса: Межведомст. науч. сборн. / Под ред. А.Ф. Косенко и др. - Киев: Лыбидь - 1992. - Вып. 26. - С. 116-122.

37. Шостаковська І.В., Гордій С.К., Долиба М.М., Бабський А.М., Музика Ф.В., Горинь О.В., Кургалюк Н.М. Роль катехоламінів і ацетилхоліну в регуляції дихання та окисного фосфорилування в секреторних клітинах та їх мітохондріях // Актуальні проблеми фізіології: Тез. доп. - Київ: Либідь, 1992. - С. 54-55.

38. Коробов В.Н., Долиба Н.М., Телегус Я.В. Карнозин в адаптации к гипобарической гипоксии // Биохимия. - 1993. - Т. 58, Вып. 5. - С. 740-743.

39. Долиба Н.М. Изменение дыхания и окислительного фосфорилрования в митохондриях печени в процессе адаптации животных к гипоксической гипоксии // Транспорт кислорода и механизмы антиоксидантной защиты: Материалы международной конф. - Гродно, 1993. - С. 20-21.

40. Абдула Лакаль, Долиба Н.М. Адаптация животных к гипоксии как фактор повышения энергетического обмена миокарда к стрессовым нагрузкам // Транспорт кислорода и механизмы антиоксидантной защиты: Материалы международной конф. - Гродно, 1993. - С. 5.

41. Ватаманюк М.З. Ионы кальция в механизме действия ацетилхолина на дыхание и окислительное фосфорилирование в митохондриях // Транспорт кислорода и механизмы антиоксидантной защиты: Материалы международной конф. - Гродно, 1993. - С. 15-16.

42. Долиба М.М. Механізми холінергічної регуляції енергетичного обміну на субклітинному, органному і організменному рівнях та її фізіологічне значення // Науково-методичні аспекти фізіології: З'їзд західно-регіонального відділення Українського фізіологічного товариства. - Львів, 1993. - Ч. 1. - С. 25-27.

43. Долиба М.М., Кургалюк Н.М., Горинь О.В., Абдула Лакаль, Музыка Ф.В., Ватаманюк М.З. Роль іонів кальцію в механізмі дії холінотропних речовин на енергетичний обмін в мітохондріях // Науково-методичні аспекти фізіології: З'їзд західно-регіонального відділення Українського фізіологічного товариства. - Львів, 1993. - Ч. 1. - С. 27-28.

Н. М. Долиба

**ХОЛИНЕРГИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА  
В МИОКАРДЕ И ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ОРГАНАХ**

**Резюме**

Изучено влияние нейротрансмиттера парасимпатической нервной системы ацетилхолина (АХ) на энергетический обмен в митохондриях (МХ), перфузированных органах и тканях целого организма. Обнаружено, что АХ в дозах 25, 50 и 100 мкг на 100 г массы через 5, 15 и 30 мин после внутрибрюшинного введения усиливает скорость АДФ-стимулирующего дыхания и фосфорилирования АДФ, транспорт кальция и субстратное фосфорилирование в МХ миокарда, печени, поджелудочной железы и слизистой тонкой кишки крысы и морской свинки при окислении  $\alpha$ -кетоглутарата (КГЛ). При этом активация окисления КГЛ АХ-ом обеспечивается усилением образования этого субстрата в аминотрансферазных реакциях и сопровождается торможением окисления сукцината. Доказано, что основной эффект АХ, заключающийся в активации окисления КГЛ и повышении сопряжения дыхания и фосфорилирования, воспроизводится на изолированных перфузированных печени и сердце крысы. С помощью ядерно-магнитно-резонансной спектроскопии и НАДН-флуориметрии *in vivo* показано, что АХ и норадреналин вызывают окисление НАДН и соответственно влияют на скорость поглощения кислорода тканью сердца собаки. Установлено, что АХ снижает, а норадреналин повышает скорость поглощения кислорода и это обусловлено активацией окисления в МХ двух разных субстратов - КГЛ и сукцината.

М. М. Долиба

**CHOLINERGIC REGULATION OF ENERGY METABOLISM IN  
MYOCARD AND DIGESTIVE ORGANS**

**Summary**

The influence of acetylcholine (ACh) on energy metabolism in mitochondria, perfused organs and a tissues of whole organism has been under study. Taken in doses of 25, 50 and 100 mg per 100 g of body weight 5, 15 and 30 min after intraperitoneal injection it intensifies the rate of ADP phosphorylation or calcium transport and substrate-level phosphorylation in mitochondria from liver, heart, pancreas and intestinal mucosa of rat and guinea pig at  $\alpha$ -ketoglutarate (KG) oxidation. Here activation of KG oxidation by ACh is due to intensification of the substrate formation in aminotransferase reactions and takes place alongside with slowing down of succinate oxidation. It has been proved, that the principal effect of ACh, consisting in activation of KG oxidation and in increase of respiration and phosphorylation coupling, is reproduced on an isolated perfused liver and heart of rats. By means of  $^{31}\text{P}$  NMR and NADH fluorometry *in vivo* it is stated that ACh and noradrenaline cause increased oxidation of NADH and reciprocally influence the rate of oxygen consumption by heart tissue of a dog. The ability of ACh to decrease and noradrenaline to increase the rate of oxygen consumption due to activation of oxidation in mitochondria of two different substrates (KG and succinate) has been discovered.

1630152

АВ 28.434  
**АВ 28.434**

Формат 60×84/16. Папір офс. Друк. офс. Ум. друк. арк. 2,56. Ум. фарб.-  
відб. 2,67. Обл. вид. арк. 2,49. Тираж 100 прим. Зам. 3155.

---

Обласна книжкова друкарня, 290000, Львів, вул. Стефаника, 11.